

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Maja Krhan  
938/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA  
VISOKIH SNAGA I DODATKA  
ANTIOKSIDANSA NA  
POLIFENOLNI I AROMATSKI  
SASTAV VINA CABERNET  
SAUVIGNON TIJEKOM  
STARENJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić te uz pomoć doc. dr. sc. Natke Ćurko, doc. dr. sc. Marine Tomašević i Katarine Lukić, mag. inž. te u Laboratoriju za tehničku termodinamiku Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz pomoć prof. dr. sc. Mladena Brnčića. Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta „Novi enološki postupci kao alternativa sumporovom dioksidu u proizvodnji visokokvalitetnih vina“ (IP-09-2014-3796) financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

*Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima, sestri i bratu. Hvala Vam što ste mi omogućili školovanje i uvijek nesebično pomagali te bili moja najveća podrška u najtežim trenucima. Zahvaljujem svojim prijateljicama na međusobnoj potpori, savjetima i istinskom prijateljstvu tijekom cijelog studiranja.*

*Veliko hvala asistentici Katarini Lukić, mag. ing. na nesebičnoj pomoći i savjetima pri izvođenju eksperimentalnog dijela kao i pri pisanju diplomskog rada.*

*Također se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić na iznimnoj susretljivosti i pomoći pri izradi ovog rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno tehnološko inženjerstvo  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina  
Laboratorij za tehničku termodinamiku

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA POLIFENOLNI I AROMATSKI SASTAV VINA CABERNET SAUVIGNON TIJEKOM STARENJA

*Maja Krhan, 938/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav i aromu crnog vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja u bocama. Koncentracije ukupnih fenola, antocijana i tanina određene su primjenom spektrofotometrijskih metoda. Sastav slobodnih antocijana u vinu određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Spojevi arome analizirani su primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS). Nakon tretmana utvrđeno je blago smanjenje ukupnih fenola te niže koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana posebno u vinu sa sniženom koncentracijom antioksidansa. Također, utvrđene su nešto niže koncentracije estera, hlapivih masnih kiselina i norizoprenoida posebice u vinu sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida i bez dodatka glutaciona.

**Ključne riječi:** *ultrazvuk visokih snaga, antioksidansi, polifenolni spojevi, aroma, vino*

**Rad sadrži:** 60 stranica, 14 slika, 04 tablica, 110 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić*

**Pomoć pri izradi:** *doc.dr.sc. Natka Ćurko, doc.dr.sc. Marina Tomašević, Katarina Lukić, mag.inž.*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Prof.dr.sc. *Mladen Brčić*
2. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević Ganić*
3. Doc.dr.sc. *Natka Ćurko*
4. Doc.dr.sc. *Filip Dujmić* (zamjena)

**Datum obrane:** 24. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Department of Process Engineering  
Laboratory for Technology and Analysis of Wine  
Laboratory for Technical Thermodynamics

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### THE EFFECT OF HIGH POWER ULTRASOUND AND ANTIOXIDANTS ADDITIONS ON POLYPHENOLIC AND AROMATIC COMPOSITION OF CABERNET SAUVIGNON WINE DURING AGING

*Maja Krhan, 938/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to investigate whether high-power ultrasound and antioxidants additions affects polyphenolic content and aroma of Cabernet Sauvignon wine after 3 months of bottle aging. Concentration of total phenols, anthocyanins and tannins was determined using spectrophotometric methods. The composition of free anthocyanins in wine was determined by application of high performance liquid chromatography (HPLC). The aroma compounds were analyzed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS). After treatments, a slight decrease of total phenols as well as lower concentrations of total and free anthocyanins were observed, especially in wine with a lower concentration of antioxidants. Also, a slightly lower concentrations of esters, volatile fatty acids and norisoprenoids were determined, particularly in ultrasound treated wine with a lower concentration of sulfur dioxide and without addition of glutathione.

**Keywords:** *high power ultrasound, antioxidants, polyphenolic compounds, aroma, wine*

**Thesis contains:** 60 pages, 14 figures, 04 tables, 110 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačičeva 23, Zagreb.

**Mentor:** *PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Natka Ćurko, Assistant professor, PhD. Marina Tomašević, Assistant professor, Katarina Lukić, mag. ing.*

**Reviewers:**

1. PhD. *Mladen Brnčić*, Full professor
2. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
3. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
4. PhD. *Filip Dujmić*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defended:** 24 September 2019

Sadržaj	stranica
<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	2
2.1. Ultrazvuk	2
2.1.1. Mehanizam ultrazvuka	3
2.1.2. Podjela ultrazvuka i primjena u prehrambenoj industriji	5
2.1.3. Primjena ultrazvuka u vinarstvu	6
2.2. Upotreba antioksidansa	7
2.2.1. Sumporov dioksid	7
2.2.2. Glutation	9
2.3. Polifenolni spojevi vina	10
2.3.1. Antocijani	11
2.3.2. Tanini	12
2.4. Aroma vina	13
2.4.1. Primarna aroma vina	14
2.4.2. Sekundarna aroma	14
2.4.3. Aroma fermentacije	14
2.4.4. Aroma starenja	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	17
3.1. Materijal	17
3.1.1. Uzorci vina	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Aparatura i pribor	18
3.2. Metode	19
3.2.1. Priprema uzoraka	19
3.2.2. Tretiranje vina ultrazvukom visokih snaga	19
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola u crnom vinu	20
3.2.4. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu	21
3.2.5. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu	21
3.2.6. Određivanje slobodnih antocijan-3- <i>O</i> -glukozida, antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetata i antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarata u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)	22
3.2.7. Određivanje spojeva arome crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)	24
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	26
4.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav crnog vina	27
4.1.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih fenola u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja	27
4.1.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih tanina u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja	28
4.1.3. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih antocijana u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja	30
4.1.4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju slobodnih antocijan-3- <i>O</i> -glukozida, antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetata i antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarata	31

4.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na aromatski sastav crnog vina .....	37
4.2.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju norizoprenoida, etilnih i acetatnih estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina u crnom vinu .....	37
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>50</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>51</b>



# 1. UVOD

Znanstvena istraživanja u posljednje vrijeme usmjerena su na pronalaženje novih metoda kojima bi se smanjila ili zamijenila upotreba sumporovog dioksida. Upotreba sumporovog dioksida u proizvodnji vina je gotovo nezamjenjiva zbog njegovih antimikrobnih i antioksidacijskih svojstava, ali činjenica je da sulfiti kod osjetljivih pojedinaca (oko 1 % populacije) mogu uzrokovati negativne kliničke reakcije poput dermatitisa, urtikarije, crvenila pa sve do anafilaktičkih i astmatičnih napadaja opasnih po život (Vally i sur., 2009; Webber i sur., 2017) te bi se više koncentracije sumporovog dioksida trebale izbjegavati zbog zdravstvenih, prvenstveno pseudo-alergijskih svojstava (Timbo i sur., 2004). Iz spomenutih razloga glavni izazov u vinarstvu je razvoj tehnika koje će smanjiti sumporenje vina, a istovremeno očuvati kvalitetu. Osim ultrazvuka visokih snaga kao moguće alternative u prehrambenoj industriji spominju se visoki hidrostatski tlak te u novije vrijeme i hladna plazma.

Korištenje ultrazvuka se najčešće povezuje s uništavanjem nekih nepoželjnih mikroorganizama, a zahvaljujući kavitaciji ubrzavaju se određene kemijske reakcije koje se događaju nakon dugogodišnjeg prirodnog starenja vina (García Martín i Sun, 2013). Primjenom ultrazvučnih valova, vina mogu brzo postići vrhunsku kvalitetu, ali ju i zadržati znatno duže od prirodnog procesa starenja (Kalkan Yıldırım i Dündar, 2017).

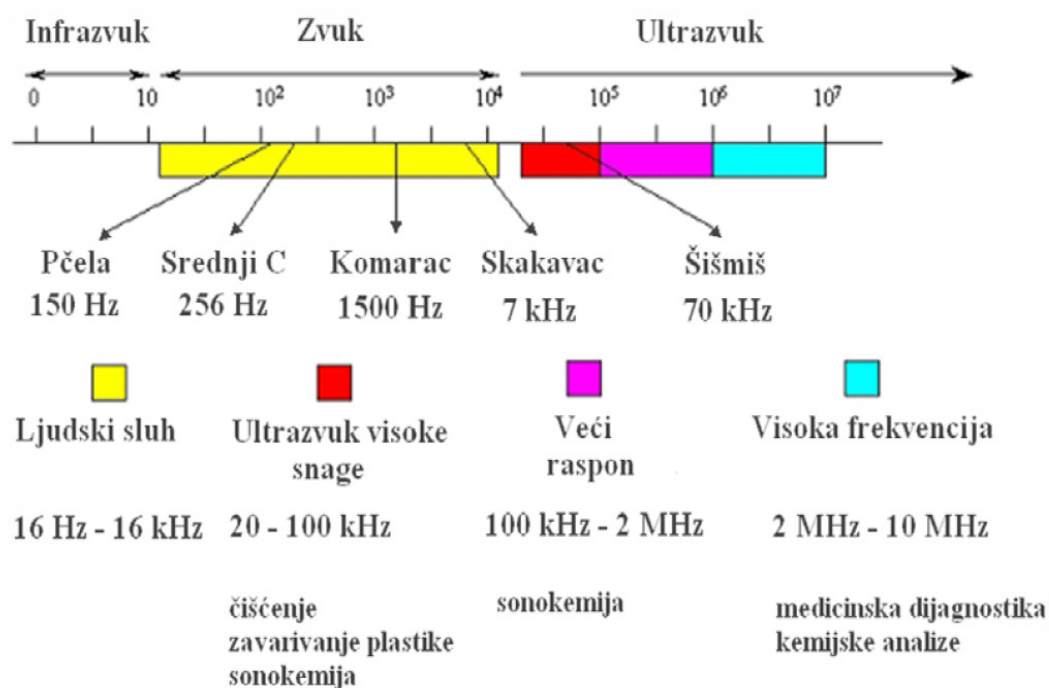
Ultrazvuk je već našao primjenu u prehrambenoj industriji, a uskoro bi se mogao potencijalno koristiti i u vinarstvu. Njegovom uporabom će se nastojati povećati kvaliteta vina, njegova stabilnost te smanjenje ukupnih troškova. Pravilna primjena ultrazvuka zahtijeva primjenu odgovarajućih procesnih parametara kao što su snaga, amplituda zvučnog vala i frekvencija kako ne bi došlo do nepoželjnih promjena u kvaliteti tretiranog proizvoda.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav i aromu crnog vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja u bocama. Dobiveni rezultati ovog rada dati će uvid u nove spoznaje o učinkovitosti i potencijalnoj primjeni ove tehnike u proizvodnji vina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ULTRAZVUK

Ultrazvučni valovi su slični zvučnim valovima, ali imaju frekvencije više od 16 kHz pa ih ljudsko uho ne može čuti. U prehrambenoj industriji primjenjuju se ultrazvučni valovi dvaju područja frekvencija. To su ultrazvučni valovi niskog intenziteta (manje od  $1 \text{ W cm}^{-2}$ ) i frekvencija 5 do 10 MHz te ultrazvučni valovi visokog intenziteta ( $10$  do  $1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) i frekvencija viših od 2,5 MHz. Ultrazvučni valovi niskog intenziteta ne izazivaju fizička oštećenja materijala, i mogu se koristiti u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane. Za razliku od njih, ultrazvučni valovi visokog intenziteta, zbog velike snage kojom djeluju na materijal, izazivaju fizička oštećenja tkiva na čemu se zasniva primjena ove tehnike u različitim procesima prerade i konzerviranja hrane (Lelas, 2006). Zvučni valovi mogu se podijeliti s obzirom na frekvenciju u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu (Slika 1.).



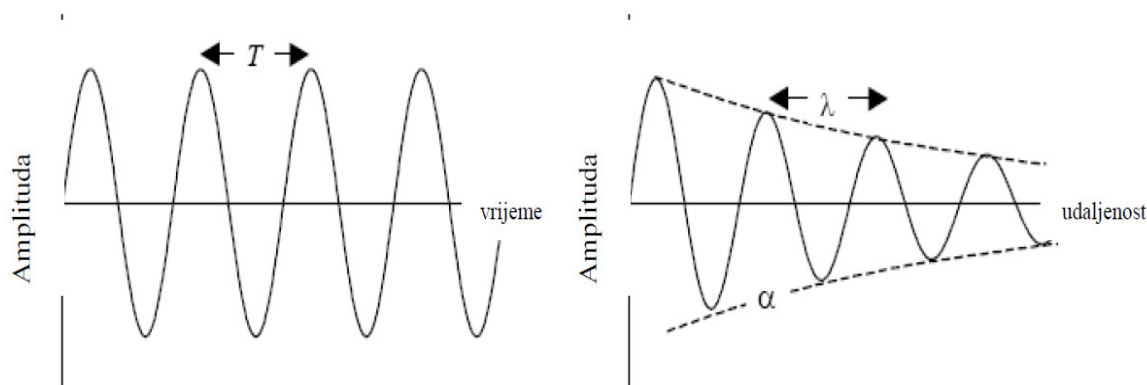
Slika 1. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Povey i Mason, 1998)

Za primjenu u prehrambenoj industriji najznačajnije su frekvencije ultrazvuka više od 20 kHz. Zvučni val određen je svojom amplitudom  $[A]$  i frekvencijom  $[f]$ , te valnom duljinom  $[\lambda]$  i koeficijentom prigušenja  $[\alpha]$  koji je mjera smanjenja amplitude ultrazvučnog vala nakon

njegova prolaska materijalom. Koeficijent prigušenja  $[\alpha]$  materijala može se definirati sljedećim izrazom (1):

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha x} \quad (1)$$

gdje je  $A_0$  početna amplituda zvučnog vala, a  $x$  je prijeđena udaljenost. Glavni uzroci prigušenja su adsorpcija i raspršivanje. Adsorpcija je uzrokovana fizikalnim mehanizmom koji pretvara ultrazvučnu energiju u toplinu. Raspršivanje se očituje u heterogenim materijalima, kao što su pjene, suspenzije i emulzije. Za razliku od adsorpcije, energija je uslijed raspršivanja još uvijek spremljena u obliku ultrazvučne energije, ali se ne registrira jer su njezin smjer i faza prenošenja promijenjeni (McClements, 1995).



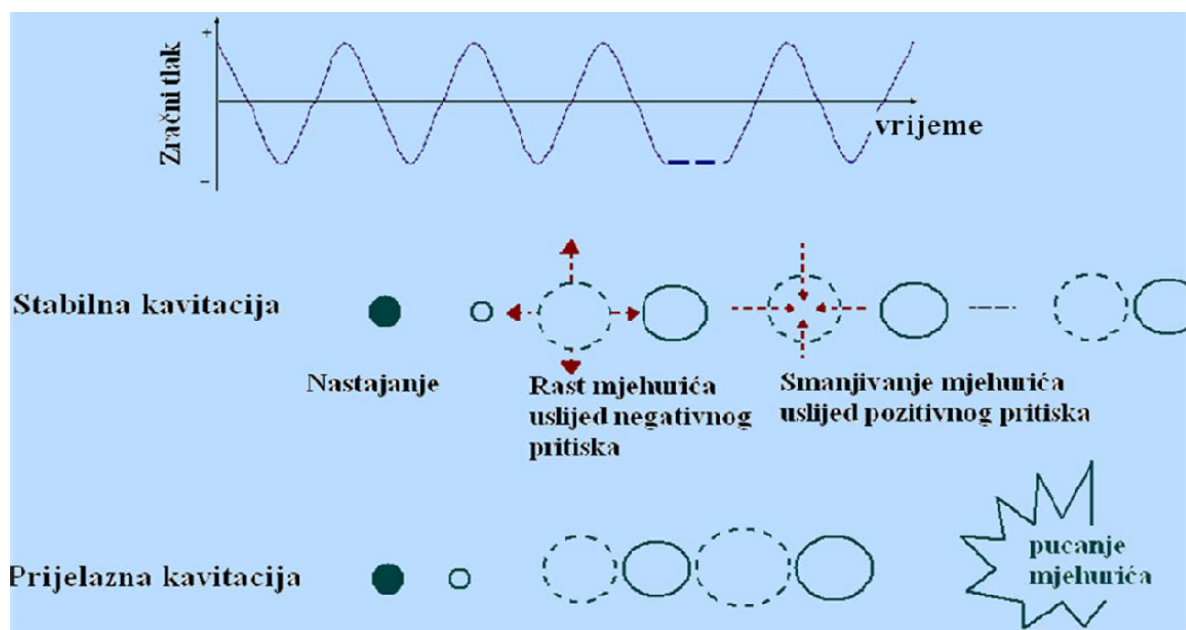
Slika 2. Promjene amplitude ultrazvuka kod određenih položaja u materijalu (lijevo), te kod određenog vremena (desno).  $T$  je udaljenost između susjednih maksimuma vala,  $\lambda$  je valna duljina i  $\alpha$  je koeficijent atenuacije (McClements, 1995).

Na Slici 2. prikazana je promjena amplitude ultrazvučnog vala kod određenih položaja u materijalu i kod određenog vremena. Prolaskom vala kroz materijal te povećanjem udaljenosti smanjuje se i amplituda vala ( $A$ ) zbog prigušenja (atenuacije). Koeficijent prigušenja ( $\alpha$ ) je mjera smanjenja amplitude ultrazvučnog vala nakon njegova prolaska materijalom. Definira se izrazom:  $A = A_0 \cdot e^{-\alpha x}$ ; gdje je  $A_0$  početna amplituda zvučnog vala, a  $x$  je prijeđena udaljenost.

### 2.1.1. Mehanizam ultrazvuka

Ultrazvučni valovi u kontaktu s namirnicom stvaraju silu koja, ovisno o smjeru djelovanja, izaziva kompresiju ili smicanje valova koji putuju kroz namirnicu. Zbog toga dolazi do promjena u tlaku i temperaturi namirnice, dolazi do kavitacije, stvaraju se slobodni radikali,

oštećuju membrane stanica, izazivaju kemijske reakcije. Sve je to moguće iskoristiti pri obradi hrane izazivanjem određenih poželjnih efekata, kao što su ubrzanje poželjnih kemijskih reakcija, poticanje i ubrzavanje kristalizacije, olakšavanje ekstrakcije, homogenizacije i emulgiranja, ubrzavanje procesa sušenja, uništenje mikroorganizama, inaktivacija enzima (Lelas, 2006).



Slika 3. Stabilna i prijelazna kavitacija (Kuijpers i sur., 2002)

Prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij stvaraju se longitudinalni valovi koji uzrokuju stvaranje alternativne kompresije i razrjeđenje dijelova medija (Povey i Mason, 1998). U ovisnosti o primijenjenoj frekvenciji i amplitudi zvučnog vala, može se promatrati velik broj fizikalnih, kemijskih i biokemijskih učinaka. Kod obrade hrane važna je činjenica da se tretiranjem ultrazvukom razvija toplina, zbog nastanka kavitacije (implozije mjehurića plina) koja uzrokuje brzu promjenu temperature do 5500 K (5227 °C) i tlaka do 50 MPa (Leighton, 1998).

Temperatura i tlak generirani su tijekom vrlo kratkih razdoblja na mjestu gdje se dogodila kavitacija (Suslick, 1988). Količina energije koja se oslobađa zbog kavitacije ovisi o kinetici rasta i raspada mjehurića (Slika 3.). Ova energija trebala bi se povećati s porastom napetosti površine na međufazi mjehurića, a smanjiti s tlakom pare tekućine. U namirnicama s velikim udjelom vode postoji visoka površinska napetost, tako da ona može biti vrlo prikladan medij za stvaranje kavitacije (Batur i sur., 2010).

Smične sile i brze promjene tlakova nastale djelovanjem ultrazvuka efikasno uništavaju mikrobnе stanice, osobito kada se djelovanje ultrazvuka kombinira s drugim tretmanima kao što su zagrijavanje ili promjena pH vrijednosti (Lillard, 1994). Ispitivanja kombinacije djelovanja topline, ultrazvuka i tlaka pokazala su da je letalni efekt na mikroorganizme 6 do 30 puta veći nego kod toplinskog tretiranja koje se provodi na istoj temperaturi (Sala i sur., 1995). Letalno djelovanje ultrazvuka na mikroorganizme posljedica je stanjivanja stanične membrane, djelovanja nastalih slobodnih radikala te razvijene topline (Lelas, 2006).

#### 2.1.2. Podjela ultrazvuka i primjena u prehrambenoj industriji

Ultrazvuk niske snage je ultrazvuk intenziteta manjeg od  $1 \text{ W cm}^{-2}$  i frekvencije više od 100 kHz (Brnčić i sur., 2009). Uspješno se primjenjuje za neinvazivnu detekciju (kontrolu operacije) i za karakterizaciju fizikalno-kemijskih značajki materijala (procjenu proizvoda i kontrolu) te stimulaciju aktivnosti živih stanica, površinsko čišćenje hrane, utjecaj na enzime, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, kristalizaciju, emulgiranje, filtraciju, operacije sušenja i smrzavanja te omekšavanje mesa (Povey i Mason, 1998). Ultrazvuk niske snage posjeduje svojstva koja ga čine prikladnim za ispitivanje struktura i značajki prehrambenih sustava tijekom obrade.

Ultrazvuk visoke snage je ultrazvuk intenziteta višeg od  $1 \text{ W cm}^{-2}$  (uobičajeno u rasponu od 10 do  $1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) i frekvencija između 18 i 100 kHz (McClements, 1995). Ultrazvuk visoke snage niskih frekvencija (20 do 100 kHz) smatra se “snažnim ultrazvukom” jer uzrokuje kavitaciju te ima primjenu u prehrambenoj industriji kod ozračivanja tekuće hrane, za induciranje reakcija oksidacije/redukcije, za ekstrakciju enzima i proteina, za inaktivaciju enzima i za indukciju nukleacije kod kristalizacije (Thakur i Nelson, 1997). Kombinacija ultrazvuka s topline i tlakom (manotermosonifikacija) pokazala se učinkovitom u inaktivaciji enzima otpornih na toplinu (Vercet i sur., 1997). Ultrazvuk visoke snage dokazano je koristan u nastajanju kristala leda tijekom zamrzavanja vode (Li i Sun, 2002). Pod utjecajem jakog ultrazvuka dolazi do skraćivanja vremena između inicijacije kristalizacije i potpune tvorbe leda te time smanjenja oštećenja stanice. Istraživanja nekih autora (Lima i Sastry, 1990) pokazala su da snažni ultrazvuk pospješuje prijenos topline. Ultrazvuk visoke snage generiran periodičnim mehaničkim gibanjima sonde, prenosi ultrazvučnu energiju u tekući medij i uzrokuje vrlo velike promjene u tlaku, koje dovode do stvaranja malih i brzo rastućih mjehurića (Povey i Mason, 1998). Mjehurić se širi tijekom

negativnog tlaka te implodira tijekom pozitivnog tlaka stvarajući visoke temperature, tlakove i sile na vrhu sonde (Suslick, 1988).

### 2.1.3. Primjena ultrazvuka u vinarstvu

Jedna od poželjnijih tehnika, općenito u obradi hrane, prema kojoj su u novije vrijeme usmjerena mnoga istraživanja je primjena ultrazvuka. Godine 1937. ultrazvučni valovi se prvi put primjenjuju kako bi izazvali termodinamičke promjene u fermentiranim i destiliranim alkoholnim pićima s ciljem imitiranja promjena koje bi se prirodno pojavile u piću (Bachmann i Wilkins, 1937). Tijekom narednih desetljeća tretman ultrazvukom u vinima i alkoholnim pićima provodio se s ciljem postizanja bolje kvalitete proizvoda (García Martín i sur., 2016). Primjena ultrazvuka visokih snaga u vinarstvu usmjerena je na mikrobnu aktivnost tijekom fermentacije, ekstrakciju polifenolnih i aromatskih spojeva iz grožđa u mošt te za ubrzavanje reakcija starenja i dozrijevanja u vinu.

Tretman ultrazvukom osigurava visoku temperaturu i visoki tlak što dovodi do modifikacije kemijskih reakcija (Suslick, 1989), kao što su fragmentacija i lančana rekombinacija polimera (Chang, 2005). Kombinacija topline, tlaka i turbulencije ubrzava prijenos mase u kemijskim reakcijama, stvara nove reakcijske putove, razgrađuje ili stvara različite spojeve od onih dobivenih pri konvencionalnim uvjetima (Patist i Bates, 2008).

Ultrazvuk može ubrzati sve reakcije koje se javljaju tijekom procesa starenja: oksidativne reakcije (uključujući ili ne molekularni kisik) i reduktivne reakcije (Ferraretto i Celotti, 2016). Jedna od najvažnijih promjena koja se događa tijekom starenja i dozrijevanja vina je stabilizacija boje nastala kopigmentacijom antocijanidina, formiranje novih tvari boje i postepeno formiranje tanin-tanin i antocijanidin-tanin kompleksa (Boulton, 2001; Jackson, 2008).

U zadnjih nekoliko godina ispitan je utjecaj ultrazvuka na fizikalno-kemijski sastav crnih vina (Zhang i sur., 2016) te su autori zaključili da različiti uvjeti ultrazvučnog tretmana značajno mijenjaju koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i električnu vodljivost. Prema tome, ultrazvuk se pokazao kao potencijalna metoda za ubrzavanje procesa starenja i dozrijevanja vina (García Martín i Sun, 2013).

U posljednje vrijeme ispituje se mogući učinak ultrazvuka na ekstrakciju polifenolnih spojeva te spojeva arome u različitim fazama procesa proizvodnje (Ferraretto i sur., 2013). Polifenolni spojevi i spojevi arome smješteni su u stanicama kože grožđa i njihovo oslobađanje je olakšano mehaničkim djelovanjem, razaranjem tkiva i stanica te temperaturom i alkoholom. Povećanje koncentracije tanina i antocijana u vinu, glavnih polifenolnih spojeva odgovornih za okus, boju i starenje, daju vinima povećani potencijal za dozrijevanje. Stoga bi primjena procesa ekstrakcije polifenola prije fermentacije mogla poboljšati proces starenja i dozrijevanja vina (García Martín i Sun, 2013).

Ultrazvuk se također može koristiti kako bi se ubrzalo ispuštanje zaštitnih koloida iz taloga i stabiliziranje vina u vrlo kratkom vremenu (Cacciola i sur., 2013; García Martín i sur., 2013). Ultrazvučna kavitacija mogla bi olakšati otpuštanje ovih spojeva uzrokujući poremećaj staničnih stijenki i membrana (Ferraretto i Celotti, 2016).

Nadalje, ultrazvuk bi se mogao uobičajeno koristiti u prehrambenoj industriji kao relativno jeftina, neopasna i ekološki prihvatljiva tehnologija (Mason i sur., 1996; Sun i Li, 2003; Zheng i Sun, 2006), pa njegova moguća primjena u vinarstvu može postati važna tehnološka inovacija ubrzavanjem određenih reakcija u procesu proizvodnje vina (Ferraretto i Celotti, 2016).

## **2.2. UPOTREBA ANTIOKSIDANSA**

### **2.2.1. Sumporov dioksid**

Sumporov dioksid ( $\text{SO}_2$ ) jedan je od prirodno prisutnih sastojaka vina. Pri nižim koncentracijama ( $< 10 \text{ mg L}^{-1}$ ) nastaje metabolizmom kvasaca tijekom alkoholne fermentacije, dok su više koncentracije uglavnom rezultat njegovog dodavanja. Njegova primjena u vinarstvu datira još od 18. stoljeća. U odgovarajućim koncentracijama ima niz pozitivnih učinaka koji olakšavaju proizvodnju i čuvanje vina.

U vinu se nalazi kao vezani (najviše s acetaldehidom) i slobodni sumporov dioksid u koji ulazi prvenstveno molekularni oblik, nevezani oblik te nedisocirani sulfitni oblik (Sonni i sur., 2011). Količine slobodnog i vezanog sumporovog dioksida u vinu se nalaze u stanju dinamičke ravnoteže. Neki od najznačajnijih faktora koji utječu na odnose među pojedinim oblicima sumporovog dioksida su pH (pri nižem pH veći je udio molekularnog oblika) i

koncentracija određenih tvari koje se direktno vežu na dodani sumporov dioksid (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a).

Neki od pozitivnih učinaka sumporovog dioksida u vinu su (Clarke i Bakker, 2004):

- snažna antimikrobna aktivnost, dodatak  $\text{SO}_2$  prije alkoholne fermentacije inhibirat će rast autohtonih kvasaca i nepoželjnih bakterija, dok su kvasci dosta otporni na  $\text{SO}_2$ , njegovim dodatkom tijekom odležavanja i prije punjenja vina u boce značajno se smanjuje rizik od kvarenja vina djelovanjem bakterija,
- antioksidacijsko djelovanje, sumporov dioksid sprječava oksidaciju polifenolnih spojeva, što rezultira smanjenjem posmeđivanja i očuvanjem koncentracije sortnih tiola (Blanchard i sur., 2004) i estera (Roussis i Sergianitis, 2008),
- veže se s acetaldehidom i tako se smanjuje aroma po oksidiranom,
- djeluje kao „izbjeljivač“ što rezultira svjetlijom bojom vina (Jackson, 2008),
- dezinfekcijsko sredstvo, koristi se u vinarijama za čišćenje opreme i posuđa.

Veće količine sumporovog dioksida imaju negativan utjecaj na kvalitetu vina, prije svega na okus i miris, a efekt istih se povećava dozrijevanjem vina (Li i sur., 2008). Kao prag nazalne detekcije molekularnog sumporovog dioksida navode se jako niske koncentracije od 1 do 3  $\text{mg L}^{-1}$ .

Zbog negativnih utjecaja na kvalitetu vina, ali i na zdravlje potrošača zakonski su propisane maksimalno dozvoljene koncentracije sumporovog dioksida u vinima u prometu. Prema važećem pravilniku, dopuštena koncentracija ukupnog sumporovog dioksida u crnim vinima je 160  $\text{mg L}^{-1}$ , a slobodnog najviše do 30  $\text{mg L}^{-1}$  (Pravilnik, 2005).

Općenito, preporučene koncentracije slobodnog sumporovog dioksida u vinu, prije punjenja u boce su u rasponu od 15 do 40  $\text{mg L}^{-1}$ , ovisno o količini potrebnoj da se postigne 0,8  $\text{mg L}^{-1}$  molekularnog (antimikrobnog)  $\text{SO}_2$  (Tomašević, 2017).

Tijekom odležavanja vina, koncentracija sumporovog dioksida se kontinuirano smanjuje kao rezultat reakcija oksidacije katalizirane ionima bakra i željeza (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). Molekularni kisik bez prisutnosti iona metala ne uzrokuje direktnu oksidaciju



polifenolnih spojeva (Peynaud, 1996). Pokazalo se da vina punjena u boce s dodatkom SO<sub>2</sub> imaju najbolju antioksidativnu zaštitu (Brajkovich i sur., 2005; Lopes i sur., 2009).

### 2.2.2. Glutation

S obzirom na negativne strane vezane za dodatak sumporovog dioksida, nastoji se smanjiti njegova upotreba, a pritom najveći izazov predstavlja pronalazak adekvatne zamjene koja bi osigurala zaštitu buteljiranih vina (Comuzzo i Zironi, 2013). Kao jedna od zamjena spominje se dodatak reduciranog glutaciona (GSH).

GSH je tripeptid, sastavljen od glutaminske kiseline, cisteina i glicina, posjeduje antioksidativna svojstva, a prirodno je prisutan u grožđu i vinu u niskim koncentracijama (Kritzinger i sur., 2013). Na koncentraciju glutaciona u vinu utječu mnogi čimbenici, od kojih su najznačajniji sorta, *terroir* i vrijeme berbe (Cheynier i sur., 1989).

Glutation sudjeluje u sprječavanju posmeđivanja i gubitka arome vina, procesa koji se odvijaju kao rezultat oksidacije vina (Coetzee i Du Toit, 2012). Glutation onemogućava nastajanje tamnih polimera sprječavajući polimerizaciju nastalih kinona uslijed oksidacije polifenolnih spojeva (Tomašević, 2017).

Istraživanja nekih autora pokazala su da dodatak glutaciona ili kombinacije glutaciona i kafeinske ili galne kiseline rezultira sporijim smanjenjem nekoliko hlapivih estera (Roussis i sur., 2007; Roussis i Sergianitis, 2008). Također, pokazalo se da dodatak glutaciona usporava smanjenje koncentracije terpena (linalol) u suhom i slatkom vinu Muškat koje je čuvano u otvorenim bocama pri 20 °C (Papadopoulou i Roussis, 2001).

Nadalje, ispitivan je utjecaj dodatka glutaciona i N-acetilcisteina na koncentracije estera i terpena tijekom starenja bijelog vina i pokazalo se da je dodatak glutaciona usporio smanjenje koncentracija nekoliko različitih hlapivih spojeva (Papadopoulou i Roussis, 2008). Također, dodatak 20 mg L<sup>-1</sup> glutaciona u suho vino Muškat rezultirao je očuvanjem koncentracije linalola i  $\alpha$ -terpineola tijekom starenja vina (Papadopoulou i Roussis, 2001).

Dodatkom glutathiona može se značajno usporiti smanjenje koncentracije sortnih tiola tijekom starenja u bocama (Dubourdieu i Lavigne-Cruège, 2004). Budući da je glutathion tiol potencijalno se može natjecati sa sortnim tiolima za vezanje na *o*-kinone što ima za posljedicu očuvanje sortne arome (Tirelli i sur., 2010).

Nadalje, utvrđeno je da dodatak glutathiona u koncentraciji od 20 mg L<sup>-1</sup> pri nižim koncentracijama slobodnog SO<sub>2</sub> (35 mg L<sup>-1</sup>) ima značajniji efekt za očuvanje koncentracije nekoliko estera i linalola, nego visoka koncentracija slobodnog SO<sub>2</sub> (50 mg L<sup>-1</sup>) (Roussis i sur., 2007). Razlog tome može biti u sinergističkom djelovanju sumporovog dioksida i glutathiona (Webber i sur., 2014).

Međunarodna organizacija za lozu i vino (OIV) uvrstila je glutathion na popis dozvoljenih enoloških sredstava pri proizvodnji vina, u dozi od maksimalno 20 mg L<sup>-1</sup> (OIV, 2017).

### **2.3. POLIFENOLI SPOJEVI VINA**

Polifenolni spojevi igraju važnu ulogu u vinarstvu jer su odgovorni za senzorske karakteristike vina (boja, aroma, trpkoca i gorčina) te imaju važnu ulogu u procesu starenja vina (Ferraretto i Celotti, 2016). Polifenoli predstavljaju skupinu molekula biljnog podrijetla, čiju strukturu čini aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina. Uobičajena su sastavnica ljudske prehrane te se u različitim količinama nalaze u voću, povrću, vinu, voćnim sokovima, čaju i kavi (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Polifenoli iz kože, sjemenki i mesa bobice crnog grožđa ekstrahiraju se u vino tijekom procesa vinifikacije. Sastav i količina pojedinih polifenola ovisi o sorti grožđa, klimatskim uvjetima, postupcima uzgoja vinove loze i procesu proizvodnje vina (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Brojna istraživanja su pokazala da namirnice koje sadrže polifenole pozitivno utječu na zdravlje i to najvećim dijelom zbog svojih antioksidacijskih svojstava (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Mnoga istraživanja pokazala su kako antioksidacijska svojstva polifenola iz vina štite od nastanka ateroskleroze i koronarnih bolesti pa se smatra da redovita i umjerena konzumacija vina smanjuje mogućnost obolijevanja od tih bolesti (Rastija i Medić-Šarić,

2009). Osim toga dokazano je njihovo antikancerogeno, protuupalno i antimikrobno djelovanje (López i sur., 2001).

Crna vina sadrže od 1000 do 4000 mg L<sup>-1</sup> polifenolnih spojeva i po udjelu su nakon alkohola, ukupnih kiselina i ugljikohidrata. Tijekom starenja vina mijenja se sastav polifenola jer oni podliježu različitim transformacijama kao što su oksidacija (Martinez i Whitaker, 1995), kondenzacija i polimerizacija (Bakker i Timberlake, 1997), te ekstrakcija iz drveta (Chatonnet i Dubourdieu, 1998).

Polifenoli spojevi su podijeljeni u tri osnovne skupine: fenolne kiseline, flavonoidi i stilbeni. Smatra se da su fenolne kiseline mogući uzrok nestabilnosti vina, jer sudjeluju u stvaranju taloga ili su uključene u proces posmeđivanja vina. Međutim, fenolne kiseline iz vina imaju pozitivan učinak na zdravlje čovjeka, s obzirom na to da im je dokazan antioksidativni i vazodilatacijski efekt (Rastija i sur., 2016). Nadalje, flavoni i flavonoli koje nalazimo u vinu od izuzetne su biološke važnosti jer djeluju kao antioksidansi i hvatači slobodnih radikala (Rastija i sur., 2016).

### 2.3.1. Antocijani

Antocijani pripadaju grupi flavonoida, to su glikozilirani polihidroksi i polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilium kationa, odnosno flavilium kationa (Brouillard, 1982). Glavni dio antocijana je njegov aglikon, flavilium kation koji sadrži konjugirane dvostruke veze odgovorne za apsorpciju svjetla pri valnim duljinama od oko 500 nm, što omogućava pigmentu da se ljudskom oku čini crvenim (Pichler i sur., 2015).

Najveći utjecaj na sadržaj antocijana imaju sorta, klimatski uvjeti i tlo. Osim što utječu na boju crnih vina, antocijani imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje zahvaljujući svojim antioksidacijskim svojstvima. Antocijani svojim djelovanjem povećavaju otpornost organizma prema bolestima, inhibiraju nastajanje nekih vrsta tumora i pozitivno utječu na kardiovaskularni sustav (Pichler i sur., 2015).

Antocijani se nalaze u kožici bobice, a njihova sinteza započinje tijekom šare i postepeno se nakupljaju u kožici za vrijeme procesa dozrijevanja, a najzastupljeniji predstavnik antocijana je malvidin-3-*O*-glukozid u većini kultivara grožđa (Pichler i sur., 2015).

Ekstrakcija antocijana iz grožđa u vino ne ovisi samo o njihovoj koncentraciji nego i o sposobnosti kožice da ih oslobodi, a to je posljedica degradacije stanične stijenke od strane pektolitičkih enzima. Poznato je da grožđe bogato antocijanima nužno ne daje i vino intenzivne boje. Uzimajući u obzir činjenicu da se antocijani ekstrahiraju u vino tijekom procesa maceracije/fermentacije, znanje o njihovoj ekstraktibilnosti može doprinijeti kvaliteti upravljanja u ovoj fazi vinifikacije i predviđanju boje vina (Jagatić Korenika i sur., 2015).

Na stabilnost antocijana utječe njihova struktura, koncentracija u otopini, pH, temperatura, koncentracija kisika, svjetlo i prisutnost drugih tvari (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Antocijani u vinu se nalaze u ravnoteži između pet različitih molekulskih stanja. Četiri forme predstavljaju slobodne molekule, a jedna forma predstavlja molekulu povezanu sa sumpornim dioksidom. Koja će forma biti više ili manje zastupljena ovisi o pH vrijednosti vina i koncentraciji slobodnog sumporovog dioksida. Niži pH pogoduje nastanku flavijevog kationa (crvena boja), dok viša pH vrijednost pogoduje nastanku kvinoidalne forme (plavo-ljubičasta boja).

U crnim sortama prisutni su u obliku slabih kompleksa koji su međusobno povezani hidrofobnim vezama, a nastaju procesima samopovezivanja i kopigmentacije (Somers i Vérette, 1988). Flavonoidi, esteri hidroksicimene kiseline s polifenolima najčešće sudjeluju u stvaranju takvih kompleksa (Somers, 1982). Oba tipa kompleksa uzrokuju povećanje intenziteta i dubine boje, apsorpciju svjetla i općenito povećavaju stabilnost boje vina (Jackson, 2008).

Polimerizacija igra važnu ulogu u stabilizaciji boje vina, jer štiti molekule antocijanidina od oksidacije i drugih kemijskih modifikacija. Polimerizacija nastala između antocijanidina i procijanidina smanjuje taloženje tanina u vinu, a samim time i njihov gubitak. Kovalentnim vezanjem tanina s molekulama antocijanidina se također povećava obojenost vina (Jackson, 2008).

### 2.3.2. Tanini

Tanini nastaju vezanjem većeg broja molekula katehina u polilance. U usnoj šupljini reagiraju s bjelančevinama slina i talože se, što uzrokuje izrazitu astringenciju, ali i kompleksnost vina. Drugi naziv za tanine je proantocijanidini, na njih otpada oko 50%

ukupnih polifenolnih spojeva. U bijelim vinima dolaze u vrlo malim količinama. Proantocijanidini su također potencijalni antioksidansi, ali zbog složene strukture velikih polimeriziranih lanaca apsorpcija u tijelo je vrlo teška, onemogućavajući tako moguće pozitivne utjecaje (Alpeza, 2008).

Tanini se obično dijele na kondenzirane i hidrolizirajuće tanine. Kondenzirani tanini su oligomeri ili polimeri flavanola i sintetiziraju se u kožici i u sjemenkama bobice, dok hidrolizirajući tanini potječu uglavnom iz drveta, i to su galna kiselina ili esteri elaginske kiseline i glukoze (Alpeza, 2008).

Reakcija tanina i proteina sline može proizvesti mekanu balansiranu impresiju ili agresivnu koja se percipira kao intenzivan osjet trpkocē i koja nije toliko poželjna karakteristika vina. Tanini se u vino ekstrahiraju iz pokožice i sjemenke grožđa tijekom fermentacije. Tanini iz sjemenke vinu daju tijelo i strukturu, a tanini iz pokožice mu daju punoću, zaokruženost i boju (Ribėreau-Gayon i sur., 2006b). Trpkocā je jedna od najvažnijih organoleptičkih svojstava crnog vina. To je važno svojstvo suhih crnih vina jer im daje na kompleksnosti i utječe na teksturu odnosno punoću vina (Gawel i sur., 2001).

Tijekom dozrijevanja vina tanini reagiraju s antocijanima stvarajući puno stabilnije pigmente, koji su vjerojatno odgovorni za stabilnost boje crnih vina (Alpeza, 2008).

## **2.4. AROMA VINA**

Nekoliko stotina kemijskih spojeva u međudjelovanju s osjetilima šalje određenu informaciju mozgu, a rezultira psihofizičkom percepcijom koju opisujemo kao „vino“ (Robinson i sur., 2014).

U posljednje vrijeme zabilježen je bitan napredak u ispitivanju arome vina i senzornih karakteristika najvećim dijelom zahvaljujući plinskoj kromatografiji (Pineau i sur., 2007).

S obzirom na podrijetlo, aromu u vinu dijelimo na primarnu (terpeni, norizoprenoidi, pirazini, hlapivi tioli) koja potječe iz grožđa, sekundarna aroma koja se razvija tijekom obrade grožđa (ruljanje, muljanje, prešanje i maceracija), aroma fermentacije koja nastaje tijekom alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije te aroma starenja koja se oblikuje tijekom dozrijevanja i skladištenja kroz enzimatske i fizikalne reakcije vina u drvu ili boci (Swiegers i Pretorius, 2005).

#### 2.4.1. Primarna aroma vina

Najvažnija grupa spojeva primarne arome grožđa su terpeni (Jackson, 1994). U svim sortama grožđa pronađeno je oko 40 terpenskih spojeva i tek nekoliko predstavljaju važne komponente za aromu vina (Esti i Tamborra, 2006). Najjednostavniji terpeni su monoterpeni s 10 ugljikovih atoma (Pine, 1994), a nalaze se u pokožici i mesu bobice grožđa te postoje u dva oblika, slobodnom i glikozidnom. Slobodni oblici koji utječu na aromu su: geraniol, nerol, linalol, linalol oksid,  $\alpha$ -terpineol, citronelol, hotrienol i nemirisni polihidroksilatni spojevi (polioli) koji uslijed blage kiselinske hidrolize prelaze u mirisne oblike (Gunata i sur., 1993).

Norizoprenoidi su spojevi nastali iz karotenoida, kemijskih spojeva koji u biljkama štite stanice od oksidacije (Demmig-Adams i Adams, 1996). Najzastupljeniji norizoprenoidi u vinu su  $\beta$ -damaskenon,  $\alpha$ -ionon i  $\beta$ -ionon, a vinu daju voćno-cvjetni karakter (Black i sur., 2015).

Pirazini su spojevi koje u vinu nalazimo u vrlo malim koncentracijama ( $\text{ng L}^{-1}$ ), ali oni imaju značajan utjecaj na aromu vina, dajući mu miris na papriku, šparogu ili grašak (Sala i sur., 2000). Pirazini imaju bitnu ulogu u aromi Sauvignona bijelog (Allen i sur., 1991), Cabernet Sauvignona (Allen i sur., 1990) i Cabernet franca (Roujou de Boubée i sur., 2000).

Hlapivi sumporni spojevi, iako se općenito smatra da negativno utječu na aromu mogu pak pridonositi i voćnim, mineralnim, zelenim te aromama koje podsjećaju na miris dima za što su zaslužni hlapivi tioli. Ovi spojevi doprinose aromi mnogih sorti, a ponajviše Sauvignonu bijelom (Tominaga i sur., 1998).

#### 2.4.2. Sekundarna aroma

Sekundarna aroma vina nastaje tijekom primarne obrade grožđa, dakle, tijekom muljanja, ruljanja i prešanja te daljnjim kemijskim i enzimatsko-biokemijskim reakcijama u moštu. Svi tehnološki procesi kroz koje grožđe prolazi prije alkoholne fermentacije utječu na koncentraciju i intenzitet spojeva arome, ali i na nastajanje novih spojeva.

#### 2.4.3. Aroma fermentacije

Formiranje arome fermentacije odvija se za vrijeme alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije, a spojevi odgovorni za ovu aromu nastaju kao produkt metabolizma kvasaca i bakterija (Guth i Sies, 2002). Fermentacijom se povećava kemijska i aromatska kompleksnost

vina, olakšava ekstrakcija tvari iz čvrstih dijelova grožđa, transformiraju spojevi dobiveni iz grožđa te proizvede značajne količine kvašćevih metabolita (Pretorius, 2000).

Masne kiseline kratkog lanca (izomaslačna, izovalerična, maslačna i propanonska) imaju utjecaj na ukupnu aromu vina. Masne kiseline srednjeg lanca (heksanonska, oktanska i dekanska) također bitno utječu na aromu vina, a njihova koncentracija ovisi o sastavu mošta, sorti, soju kvasca i temperaturi fermentacije.

Esteri nastaju radom kvasaca kroz metabolizam lipida i acetil-CoA te su jedni od najzastupljenijih spojeva u alkoholnim pićima (Swiegers i sur., 2005). Najvažniji esteri u vinu su etilni esteri masnih kiselina i acetatni esteri, uključujući etil acetat, etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat, heksil acetat, izoamil acetat, izobutil acetat i fenil etil acetat (Swiegers i sur., 2005). Hidroliza estera može dovesti do gubitka voćnih i cvjetnih aroma mladih bijelih vina (Pérez Coello i sur., 2003).

Viši alkoholi su također produkt metabolizma kvasaca, a nastaju katabolizmom aminokiselina od strane kvasaca kroz Ehrlichov put sinteze (Swiegers i sur., 2005). Izoamil alkohol i izobutil alkohol imaju arome paljenja, slada i viskija ili gorke arome. Aromatične aminokiseline (fenilalanin i tirozin) proizvode aromatične alkohole kao što je feniletil alkohol koji ima medne i začinske arome te arome ruže i ljiljana (Francis i Newton, 2005).

U skupini karbonilnih spojeva bitno je istaknuti acetaldehid i diacetil. Najzastupljeniji karbonilni spoj u vinu je acetaldehid, nalazi se u količini od 90% od ukupne količine svih aldehida u vinu. Sintetizira se tijekom rasta kvašćevih stanica nakon što se potroši 25% šećera (Liu i Pilone, 2000). Također, zadnji je prekursor prije formiranja etanola jer piruvat kao posljednji produkt glikolize, prelazi u acetaldehid uz piruvat dekarboksilazu koji zatim uz alkohol dehidrogenazu prelazi u etanol (Delfini i Costa, 1993).

Diacetil ili 2,3-butandiol nastaje kao sekundarni metabolit alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije (Bratowsky i Henschke, 2004) te ga karakterizira maslačna aroma. Sinteza diacetila ovisi o dostupnosti aminokiselina, osobito valina i treonina. Diacetil je nestabilan produkt i često se reducira u 2,3-butandiol uz pomoć kvasaca preko acetona koji potiče tu oksido-redukcijsku reakciju (Fleet, 1993).

Jabučno-mliječna fermentacija obično se provodi nakon alkoholne fermentacije djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Tijekom jabučno-mliječne fermentacije jabučna kiselina se dekarboksilira u ugodniju mliječnu kiselinu i CO<sub>2</sub>. Provodi se u slučaju povećane kiselosti vinu te utječe na poboljšanje arome vina (Lambrechts i Pretorius, 2000).

#### 2.4.4. Aroma starenja

Faza proizvodnje vina nakon završene alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije zove se stabilizacija tijekom koje vino odležava kroz određeni period pri čemu dolazi do njegovog dozrijevanja, ali i starenja te razvoja tzv. arome starenja („bouquet starenja“). Tako je npr. odležavanje vina nakon fermentacije u hrastovim bačvama do trenutka punjenja u boce česta praksa, a jedan od glavnih razloga ovog postupka je formiranje „arome drveta“ (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Stabilizacija vina, odnosno period tijekom kojeg vino odležava nakon završene alkoholne i jabučno-mliječne fermentacije rezultira razvojem tzv. arome starenja. Čest slučaj je da vino prije punjenja u boce odležava u hrastovim bačvama pri čemu se formira „aroma drveta“ (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b).

Oksidacija postojećih aromatskih spojeva te ekstrakcija spojeva iz drveta bačve (ako vino odležava u bačvama) spada u najvažnije reakcije tijekom starenja. Oksidacijom se povećava koncentracija aldehidnih spojeva koji pridonose voćnim aromama. Također, smanjuje se koncentracija voćnih estera (*i*-amil acetat i 2-fenil acetata) te povećava koncentracija dietil sukcinata. Ekstrakcijom spojeva iz drveta bačve u vino dospijevaju različiti aromatski spojevi, kao što su: aldehidi, ketoni, laktoni i hlapivi fenoli. Koncentracija i sastav hlapivih spojeva koji potječu iz drveta bačve ovise o njezinom podrijetlu (vrsta drveta, geografska regija i starost drveta) kao i o samom načinu proizvodnje. Ovisno o vremenu odležavanja vina u bačvama različit je njihov utjecaj na aromu. Tanini drveta su u vinu dobro topivi te mogu značajno utjecati na okus, boju i miris vina (Moreno Arribas i Polo, 2008).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Uzorci vina

U ovom radu korišteno je crno vino sorte Cabernet Sauvignon iz vinarije Erdutski vinogradi d.o.o., Hrvatska, proizvedeno 2017. godine sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida. Osnovni fizikalno-kemijski parametri odabranog vina prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Cabernet Sauvignon

Alkohol	13,1 %
Ukupna kiselost	5,3 g L <sup>-1</sup>
Hlapiva kiselost	0,61 g L <sup>-1</sup>
Reducirajući šećeri	4,1 g L <sup>-1</sup>
pH	3,46
Jabučna kiselina	0,1 g L <sup>-1</sup>
Mliječna kiselina	1,3 g L <sup>-1</sup>
Ukupni sumporov dioksid	25 mg L <sup>-1</sup>
Slobodni sumporov dioksid	15 mg L <sup>-1</sup>

##### 3.1.2. Kemikalije

Reagensi korišteni u spektrofotometrijskim analizama bili su *pro analysis (p.a.)* stupnja čistoće, dok su reagensi korišteni pri plinskoj i tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti bili *pro chromatography* stupnja čistoće.

- Natrijev klorid, Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska
- n-amil alkohol, Fluka, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, bezvodni, p.a. Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogen sulfit, p.a. Acros, Geel, Belgija
- Folin-Ciocalteu reagens, Reagecon, Shannon, Irska
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska
- Mravlja kiselina (98-100 %), Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska

- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska
- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Malvidin-3-*O*-glukozid klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

### 3.1.3. Aparatura i pribor

#### Aparatura:

- Spektrofotometar, Specord 50 Plus, Analytik Jena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Termostat, Inkolab, Zagreb, Hrvatska
- HPLC Agilent Technologies 1260 Series, Santa Clara, CA, SAD, sastavljen od sljedećih komponenti:
  - Kvarerna Pumpa (Bin Pump SL) G7111B
  - Autosampler (DL-ALS) G2258A
  - Termostat Autosampler-a (FC-ALS Term) G1330B
  - Termostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B
  - Diode Array Detector (DAD VL) G1316A
  - Agilent Chemstation Softver
- Plinski kromatograf (GC), Agilent Technologies 6890 Network GC System, Santa Clara, CA, SAD
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 *Inert* Mass Selective Detector, Santa Clara, CA, SAD,
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, IL, SAD

#### Pribor:

- Mikropipete volumena 100, 1000, 5000 µL
- Pipete volumena 1, 5, 10, 15 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 mL
- Kivete od 1 cm
- Staklene tube za hidrolizu, Pyrex, Corning, NY, SAD
- SPME vlakno: 100 µm PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Magnet
- HSS bočice, 20 mL, Restek, Bellefonte, PA, SAD
- Silikonski čepovi za HSS bočice, Düren, Njemačka

- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje

### 3.2. METODE

U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na polifenolne spojeve i spojeve arome vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja u bocama.

#### 3.2.1. Priprema uzoraka

Tretman vina ultrazvukom visokih snaga uključivao je nekoliko varijanti sa i bez antioksidansa, a korišteni antioksidansi bili su sumporov dioksid i glutation. Varijante tretiranog vina bile su: (i) vino sa sniženom koncentracijom  $\text{SO}_2$  ( $15 \text{ mg L}^{-1}$  slobodnog  $\text{SO}_2$ ); (ii) vino sa sniženom koncentracijom  $\text{SO}_2$  i glutationom ( $15 \text{ mg L}^{-1}$  slobodnog  $\text{SO}_2$  uz dodatak  $20 \text{ mg L}^{-1}$  glutationa) te (iii) vino sa standardnom koncentracijom  $\text{SO}_2$  ( $30 \text{ mg L}^{-1}$  slobodnog  $\text{SO}_2$ ). Kontrolno vino bilo je vino sa standardnom koncentracijom  $\text{SO}_2$ .

#### 3.2.2. Tretiranje vina ultrazvukom visokih snaga

Za tretman vina ultrazvukom visokih snaga korištena je ultrazvučna sonda promjera 25,4 mm i ultrazvučni procesor snage 700 W i 20 kHz (Qsonica Sonicators, Newtown, SAD).

##### *Postupak tretiranja:*

Tretiranja su izvršena pri amplitudi ultrazvučnog vala od 25 % i trajanju tretmana od 6 minuta. Postupak HPU tretiranja vina bio je sljedeći: 300 mL vina uliti u staklenu čašu od 400 mL. Zatim ultrazvučnu sondu uroniti u uzorak (oko 2 cm) i centrirati u sredinu čaše. Tijekom HPU tretmana temperaturu održavati na  $25^\circ\text{C}$  hlađenjem ledom. Tretmane vina provesti u duplikatu.

Odmah nakon tretmana, provedeno je punjenje vina u boce u struji dušika. Vina su potom skladištena u hladnjaku za čuvanje vina u kontroliranim uvjetima. Uzorci vina analizirani su nakon 3 mjeseca odležavanja u bocama.

### 3.2.3. Određivanje ukupnih fenola u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Određivanje ukupnih fenola temeljeno je na reakciji fenolnih spojeva s Folin-Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Intenzitet nastalog plavog obojenja izmjeren je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u  $\text{mg L}^{-1}$ .

#### *Postupak određivanja:*

U tikvicu od 25 mL otpipetirati 250  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka crnog vina, 1,25 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) i 15 mL vode. Sve dobro promiješati i poslije 30 sekundi dodati 3,75 mL 20 % otopine natrijevog karbonata. Zatim, nadopuniti tikvicu do oznake s destiliranom vodom te ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti na isti način, s tim da umjesto uzorka treba uzeti 250  $\mu\text{L}$  destilirane vode. Nakon 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 765 nm.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Otopine galne kiseline pripremiti u 12 % etanolu sljedećih koncentracija: 100, 200, 400, 600 i 800  $\text{mg L}^{-1}$ . Postupak određivanja isti je kao prethodno opisani za određivanje ukupnih fenola u uzorcima vina. S tim da je umjesto uzorka vina potrebno uzeti otopinu određene koncentracije. Izraditi baždarni pravac, pri čemu na apscisu treba nanijeti koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm.

#### *Račun:*

Pomoću programa Microsoft Excel izraditi jednadžbu pravca prema kojoj će se izračunati koncentracije ukupnih fenola. U ovom radu izračunata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0010x + 0,0276$$

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- udjel ukupnih fenola izraženih kao ekvivalent galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$R^2$ - koeficijent determinacije

### 3.2.4. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Ukupni tanini određeni su prema Bate-Smith metodi temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1966). Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

#### *Postupak određivanja:*

Uzorak vina razrijediti 50 puta. U dvije tube za hidrolizu otpipetirati 2 mL razrijeđenog uzorka vina, 1 mL destilirane vode i 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline te hermetički zatvoriti tube. Jednu tubu ostaviti na sobnoj temperaturi, a drugu staviti u vodenu kupelj zagrijanu na 100 °C. Nakon 30 minuta, tubu izvaditi iz vodene kupelji te ohladiti tijekom 5 minuta ledom kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija kiselinske hidrolize. U obje tube dodati 500 µL etanola. Izmjeriti optičku gustoću pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

#### *Račun:*

Koncentraciju tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračunati prema formuli:

$$\text{Tanini (g L}^{-1}\text{)} = 19,33 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D<sub>1</sub>- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D<sub>2</sub>- optička gustoća nehidroliziranog uzorka

### 3.2.5. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Ukupna količina antocijana u uzorcima vina određena je metodom baziranoj na dodatku otopine natrij hidrogen sulfita te činjenici da se  $\text{HSO}_3^-$  ion veže na 2' položaj obojene molekule antocijana te ju tako prevodi iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Istovremeno, paralelni uzorak tretiran je destiliranom vodom pri čemu ne dolazi do nikakve promjene u strukturi molekule antocijana. Količinu prisutnih antocijana pokazuje razlika spektrofotometrijski određenih apsorbancija u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965).

#### *Postupak određivanja:*

U čašu od 25 mL otpipetirati 1 mL vina, 1 mL 96 %-tnog etanola s 0,1 (v/v) HCl i 20 mL 2 %-tne vodene otopine HCl. Po 10 mL ove otopine otpipetirati u dvije tikvice. U prvu tikvicu dodati 4 mL vode, a u drugu 4 mL 15 %-tne otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbanciju u obje otopine na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

#### *Račun:*

Udio antocijana u ispitivanom uzorku izračunati prema formuli:

$$A_c (\text{mg L}^{-1}) = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

$A_c (\text{mg L}^{-1})$  – količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 – faktor preračunavanja

$D_1$  – apsorbancija uzorka kojem je dodana voda

$D_2$  – apsorbancija uzorka kojem je dodana 15 %-tna otopina natrijevog hidrogensulfita

3.2.6. Određivanje slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat i malvidin-3-*O*-glukozid acetat), antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) u uzorcima vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kromatografske analize provedene su na Agilent 1260 Series

(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se od filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filter promjera 25 mm i veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Filter-Bio, LabeLtd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20  $\mu\text{L}$  ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Nucleosil C18 dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD) pri temperaturi od 40  $^{\circ}\text{C}$  te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina, 95:5; v:v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Pripremljene mobilne faze potrebno je filtrirati i ozračiti. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u Tablici 2. uz protok mobilne faze od 1  $\text{mL min}^{-1}$ .

Tablica 2. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana

<b>Vrijeme (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>Protok (<math>\text{mL min}^{-1}</math>)</b>
0	90	10	1
25	65	35	1
26	0	100	1
28	0	100	1
29	90	10	1
35	90	10	1

#### *Identifikacija i kvantifikacija:*

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm usporedbom retencijskog vremena ( $R_t$ ) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar boja. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a koncentracije pojedinačnih slobodnih antocijana izražene su kao ekvivalent malvidin-3-*O*-glukozid klorida ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su kao suma koncentracija delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozida. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati

izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

### 3.2.7. Određivanje spojeva arome crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)

Određivanje spojeva arome provedeno je primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Određeni su sljedeći spojevi arome: norizoprenoidi [ $\beta$ -damaskenon i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN)], esteri [etilni esteri (etilni butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat i dietilsukcinat), acetatni esteri (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat i 2-feniletil acetat)], viši alkoholi (*i*-amil alkohol, 1-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol i 2-fenil etanol) i hlapive masne kiseline (kapronska, kaprilna i kaprinska kiselina).

Princip GC/MS analize baziran je na razdvajanju spojeva arome u uzorku koji se strujom inertnog plina nosioca unosi na kromatografsku kolonu. Na koloni dolazi do razdvajanja sastojaka između nepokretne faze – adsorbensa i pokretne faze – plina nosioca. Vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na kromatografskoj koloni pri zadanim uvjetima naziva se retencijsko vrijeme. Na izlazu iz kolone nalazi se maseni detektor u kojem se određuje prisutnost odijeljenih sastojaka uzorka u pokretnoj fazi. U masenom detektoru dolazi do ionizacije spojeva te svaki spoj karakterizira određeni omjer mase i naboja ( $m/z$ ). Detektor redom detektira količinu eluiranih sastojaka kao funkciju vremena te na računalu dobivamo kromatogram. Svaki pik na kromatogramu karakterističan je za određeni spoj, a površina ispod pika proporcionalna je koncentraciji određenog spoja u uzorku. Integracijom površine dobiva se točna koncentracija u  $\text{mg L}^{-1}$ .

GC/MS analiza provedena je na kromatografskoj koloni BP20 dimenzija 50 m x 220  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$  (SGE Analytical Science, Victoria, Australija). Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS) bili su sljedeći:

- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Temperaturni program: 40 °C, 5 minuta  $\rightarrow$  200 °C, 3 °C/min  $\rightarrow$  240 °C, 30 °C/min



- Pokretna faza: helij
- Protok pokretne faze: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- Model injektiranja: „Splitless“

*Priprema uzorka za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME):*

U odmjernu tikvicu volumena 50 mL dodati dio uzorka vina i interni standard - *n*-amil alkohol u koncentraciji od 20 mg L<sup>-1</sup> te nadopuniti tikvicu uzorkom vina do oznake. Pripremljeni uzorak staviti u termostat na temperaturu od 20 °C. Izvagati 2 +/- 0,05 g NaCl-a na analitičkoj vagi u HSS bočicu i dodati 10 mL pripremljenog uzorka s internim standardom. Svrha dodavanja natrijevog klorida je povećati ionsku jakost, odnosno povećati učinkovitost same ekstrakcije. U HSS bočicu s uzorkom dodati magnet, a potom bočicu zatvoriti i postaviti u termoblok s magnetskom miješalicom prethodno zagrijan na 40 °C. Postaviti SPME iglu na adsorpciju uz konstantnu temperaturu i miješanje kroz 30 minuta. Nakon adsorpcije vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa i postaviti na desorpciju u trajanju od pet minuta.

*Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome:*

Identifikacija spojeva arome provedena je usporedbom retencijskih vremena spojeva s retencijskim vremenima standarda te usporedbom masenih spektara spojeva s masenim spektrima u Nist05 knjižnici masenih spektara. Kvantifikacija navedenih spojeva arome provedena je primjenom baždarnih krivulja pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg L<sup>-1</sup>. Ukupni norizoprenoidi izračunati su kao suma koncentracije  $\beta$ -damaskenona i TDN-a. Ukupni etilni esteri izračunati su kao suma koncentracije etil butanoata, etil heksanoata, etil oktanoata, etil dekanata i dietilsukcinata, dok su acetatni esteri izračunati kao suma koncentracije etil acetata, *i*-butil acetata, *i*-amil acetata i 2-feniletal acetata. Ukupni viši alkoholi izračunati su kao suma *i*-amil alkohola, 1-heksanola, *cis*-3-heksen-1-ol i 2-fenil etanola. Ukupne hlapive masne kiseline izračunate su kao suma kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline. Računalna obrada dobivenih kromatograma provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies), a analiza rezultata u programu Microsoft Excel 2016.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na polifenolni i aromatski sastav vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja u bocama. Tri mjeseca od primjene tretmana provedene su kemijske analize na tretiranim uzorcima vina Cabernet Sauvignon paralelno s kontrolnim (netretiranim) vinom.

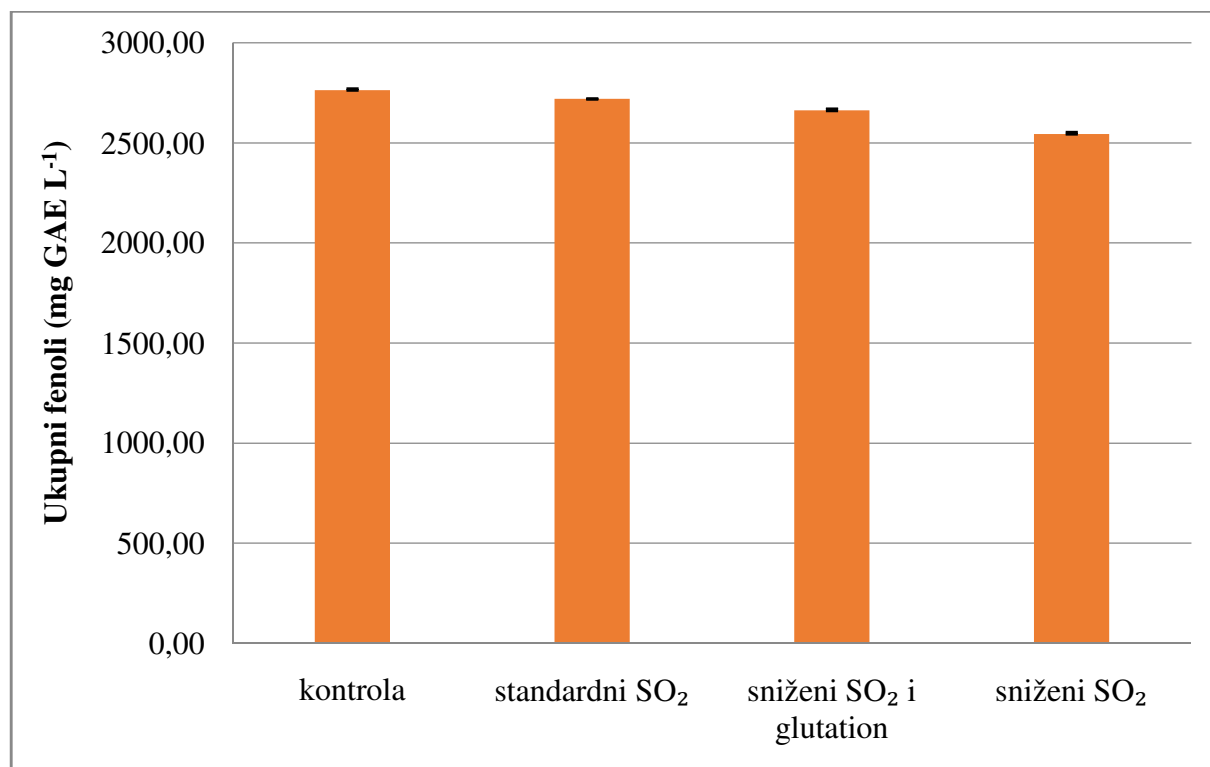
Dobiveni rezultati istraživanja prikazuju utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na glavne parametre kvalitete vina (polifenolni i aromatski sastav) 3 mjeseca nakon starenja u bocama.

Kemijske analize obuhvatile su spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, ukupnih tanina i ukupnih antocijana, a primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određene su koncentracije slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata te antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja. Također, određivanje spojeva arome crnog vina provedeno je plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).

Na Slikama 4.-14. prikazani su ukupni fenoli, ukupni tanini, ukupni antocijani, ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi, ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozid acetati, ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati, ukupni norizoprenoidi, ukupni etilni esteri, ukupni acetatni esteri, ukupni viši alkoholi te ukupne masne kiseline. U Tablicama 3. i 4. prikazani su pojedinačni rezultati analize slobodnih antocijana i spojeva arome.

#### 4.1. UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA POLIFENOLNI SASTAV CRNOG VINA

4.1.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih fenola u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja



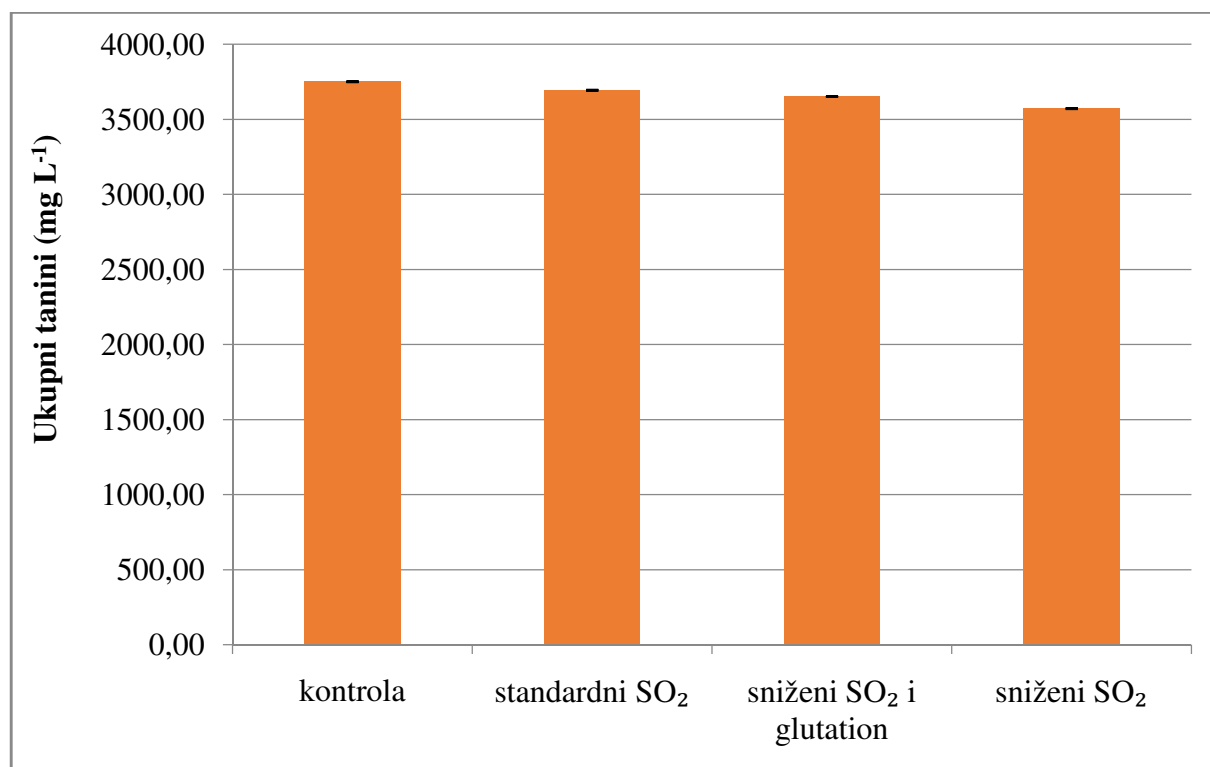
Slika 4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih fenola u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 4. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka vina 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo neznatno smanjenje koncentracije ukupnih fenola u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih fenola 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Uzrok smanjenja koncentracije ukupnih fenola u tretiranim vinima autori objašnjavaju svojstvom ultrazvuka visokih snaga da ubrza reakcije polimerizacije fenolnih komponenti u vinu, koja je inače prirodna posljedica procesa starenja vina (Ferraretto i Celotti, 2016).

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje neznatno smanjenje koncentracije ukupnih fenola, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) djeluje na usporavanje gubitka polifenolnih spojeva, a samim time utječe na očuvanje kvalitete. Dodatak sumporovog dioksida i glutationa spriječio je oksidaciju polifenolnih spojeva te potvrdio svoje antioksidacijsko djelovanje. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida, kao i uzorci sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su blago veću koncentraciju ukupnih fenola od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

#### 4.1.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih tanina u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja



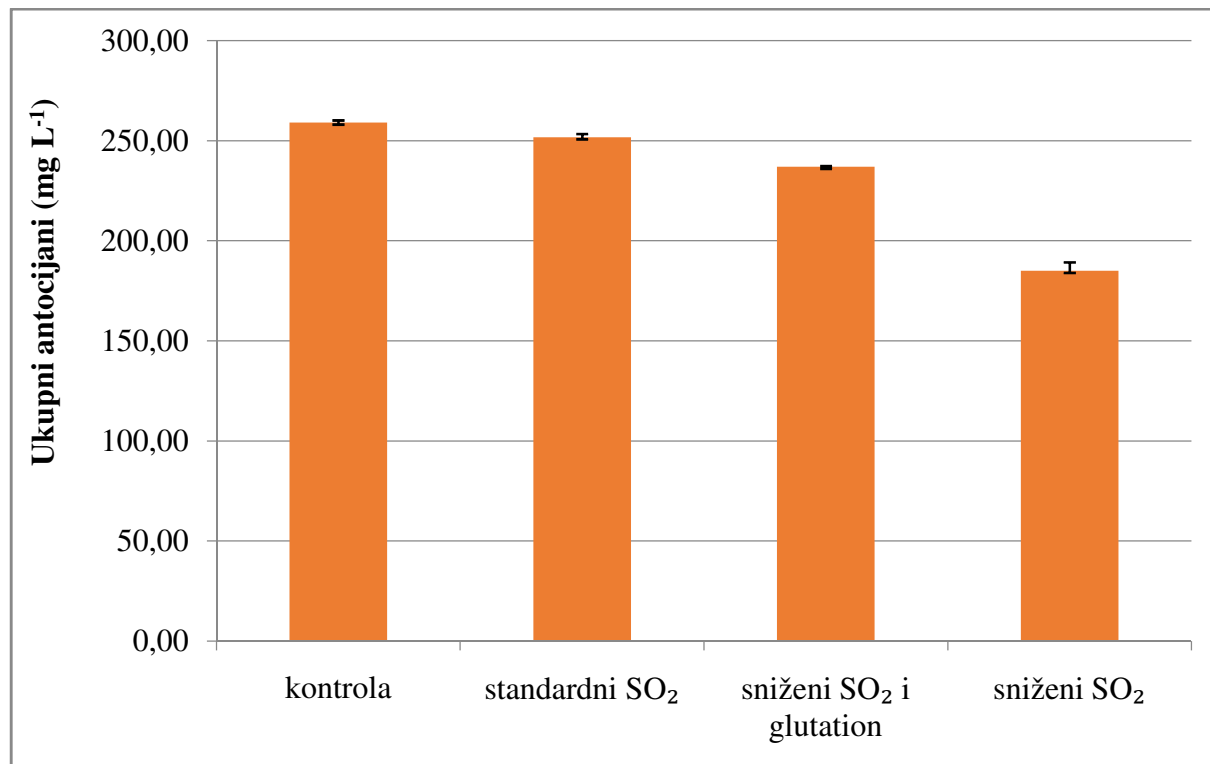
Slika 5. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih tanina u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 5. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo neznatno smanjenje koncentracije ukupnih tanina u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Neznatno manja koncentracija ukupnih tanina 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je u uzorcima sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida i sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida uz dodatak glutaciona koncentracija ukupnih tanina neznatno promijenjena.

Naime, primjena ultrazvuka visokih snaga može ubrzati reakcije polimerizacije fenolnih komponenti u vinu te postepeno dovesti do formiranja tanin-tanin i antocijanidin-tanin kompleksa (Boulton, 2001; Jackson, 2008), što je inače prirodna posljedica procesa starenja vina (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016). Smanjenje koncentracije ukupnih tanina uzrokuje povećanje stabilnosti boje i smanjenje trpkoc crnih vina, što znatno utječe na konačnu kvalitetu vina.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje neznatno smanjenje koncentracije ukupnih tanina što je u skladu s istraživanjima prethodno navedenih autora, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutacion) djeluje na usporavanje gubitka ukupnih tanina. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutacionom zadržali su neznatno veću koncentraciju ukupnih tanina od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

4.1.3. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih antocijana u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja



Slika 6. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih antocijana u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

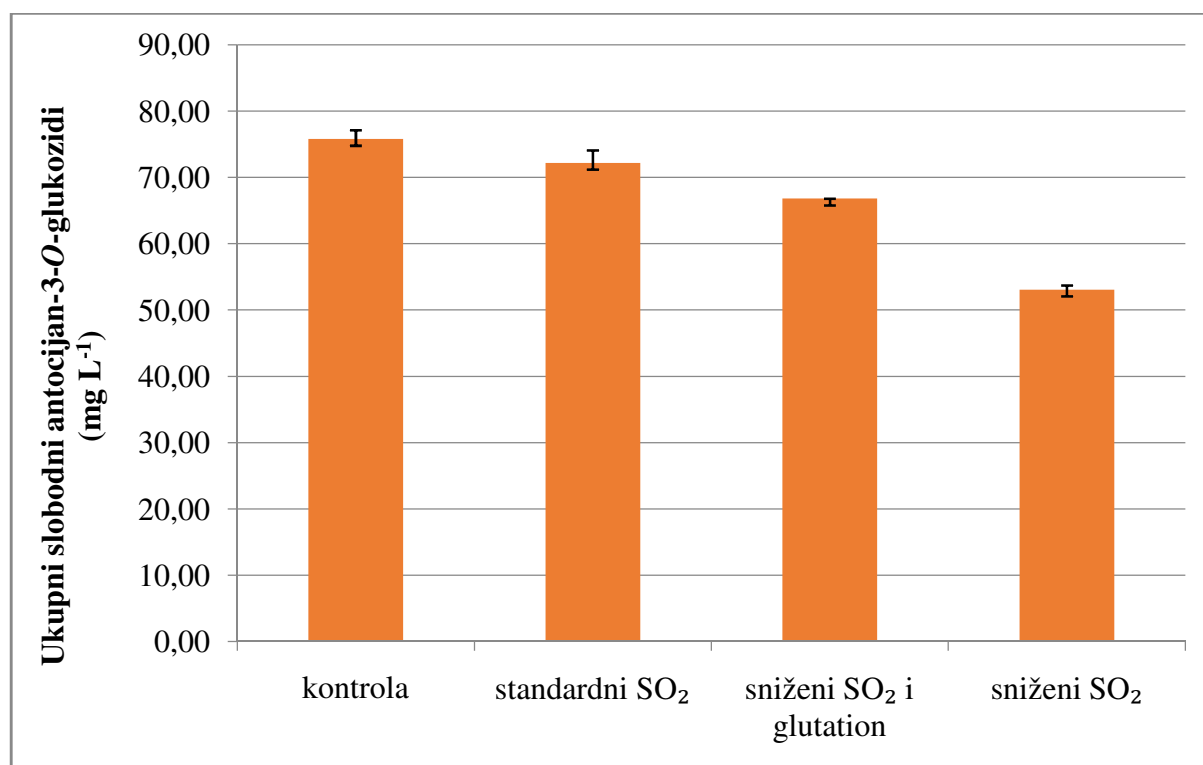
Na Slici 6. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antiosidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih antocijana 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

U uzorcima vina tretiranim ultrazvukom visoke snage dolazi do djelomične degradacije, polimerizacije i kopigmentacije antocijana što se pak očituje kroz smanjenje koncentracije ukupnih antocijana (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016; Ćurko i sur., 2017). U

vinima koja su podvrgnuta prirodnom procesu starenja, također dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih antocijana što za posljedicu ima povećanje stabilnosti boje crnih vina.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih antocijana što je u skladu s istraživanjima prethodno navedenih autora, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) djeluje na usporavanje gubitka ukupnih antocijana. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih antocijana od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

#### 4.1.4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata

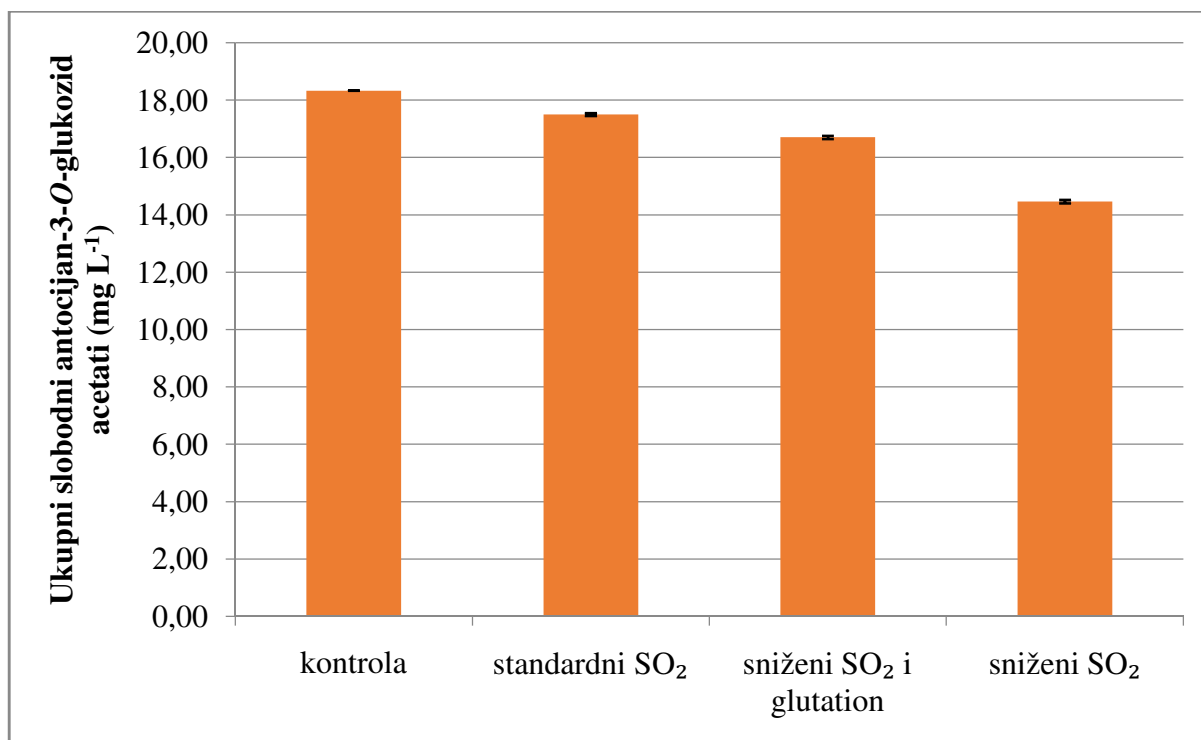


Slika 7. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 7. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida što je u skladu s istraživanjima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016), a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutathion) djeluje na usporavanje gubitka ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutathionom zadržali su veću koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.



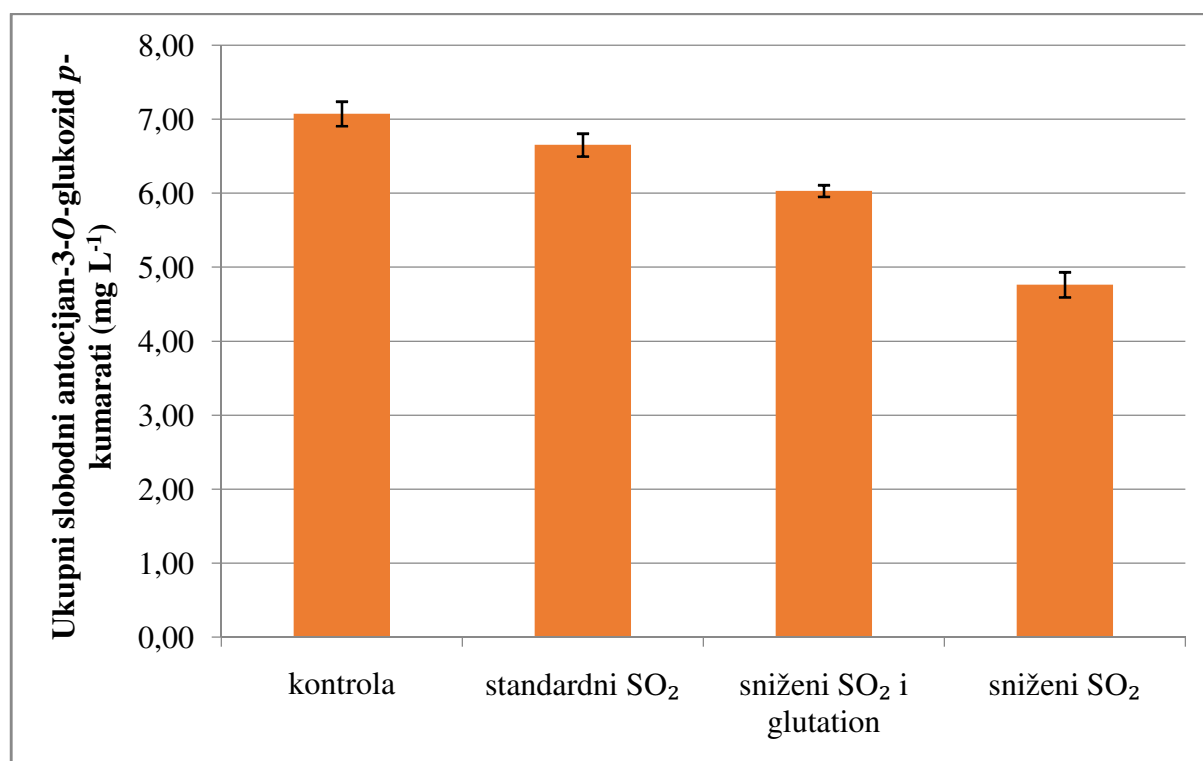


Slika 8. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 8. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata što je u skladu s istraživanjima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016), a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) djeluje na usporavanje gubitka ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u

kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.



Slika 9. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 9. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata što je u skladu s istraživanjima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016), a

dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) djeluje na usporavanje gubitka ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Tablica 3. Utjecaj ultrazvuka i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju slobodnih antocijana u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Uzorci	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>Antocijan-3-<i>O</i>-glukozidi (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	7,07 ± 0,04	6,53 ± 0,06	5,68 ± 0,02	3,72 ± 0,35
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,28 ± 0,33	1,02 ± 0,57	0,87 ± 0,02	0,84 ± 0,02
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,59 ± 0,12	5,86 ± 0,51	5,76 ± 0,12	3,91 ± 0,09
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	5,36 ± 0,30	5,25 ± 0,22	4,96 ± 0,03	3,46 ± 0,05
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	55,50 ± 0,16	53,53 ± 0,45	49,53 ± 0,21	41,16 ± 0,07
<b>Antocijan-3-<i>O</i>-glukozid acetati (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	2,06 ± 0,01	1,88 ± 0,03	1,82 ± 0,09	1,57 ± 0,24
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	16,27 ± 0,01	15,62 ± 0,01	14,88 ± 0,49	12,89 ± 0,22
<b>Antocijan-3-<i>O</i>-glukozid <i>p</i>-kumarati (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	1,52 ± 0,06	1,39 ± 0,09	1,33 ± 0,07	1,13 ± 0,06
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	5,55 ± 0,10	5,26 ± 0,08	4,71 ± 0,29	3,63 ± 0,11

Analiza koncentracije 9 slobodnih antocijana (cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat, peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) određenih u kontrolnom uzorku i uzorcima tretiranim ultrazvukom visokih snaga i antioksidansima nakon 3 mjeseca starenja prikazana je u Tablici 3. Koncentracije spojeva izražene su u mg L<sup>-1</sup>.

Rezultati su potvrdili da je malvidin-3-*O*-glukozid najdominantniji slobodni antocijan u sortama crnog vina. Sastav slobodnih antocijana u kojima malvidin-3-*O*-glukozid zauzima 38-49 %, karakterističan je za sve sorte *Vitis vinifera* L. (Ćurko i sur., 2017).

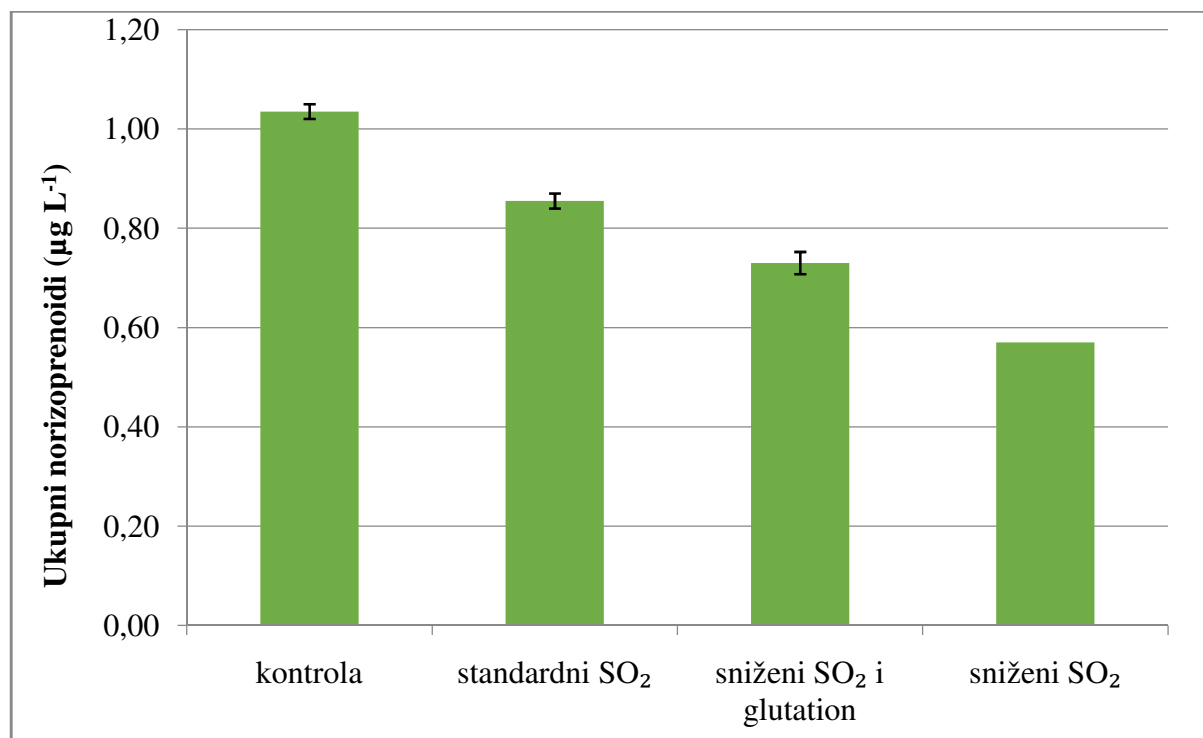
Nadalje, kao što je bilo vidljivo kod rezultata ukupnih antocijana, i u slučaju slobodnih antocijana najveća koncentracija pojedinačnih spojeva zabilježena je u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najmanja koncentracija zabilježena u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida. Može se zaključiti da je tretman ultrazvukom visokih snaga neznatno utjecao na smanjenje koncentracije slobodnih antocijana, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) rezultirao je boljim očuvanjem ovih spojeva.

Analiza uzoraka tretiranih ultrazvukom visokih snaga ukazuje na to da se tijekom tretmana javlja djelomična razgradnja i polimerizacija slobodnih antocijana, što ima za posljedicu smanjenje njihove koncentracije (Ćurko i sur., 2017).

Prema istraživanjima drugih autora (Ferraretto i Celotti, 2016) ultrazvuk visokih snaga nema negativan utjecaj na kemijsku stabilnost slobodnih antocijana, to je važno za stabilnost boje vina jer se slobodni antocijani vežu s taninima.

## 4.2. UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA AROMATSKI SASTAV CRNOG VINA

4.2.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju norizoprenoida, etilnih i acetatnih estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina u crnom vinu



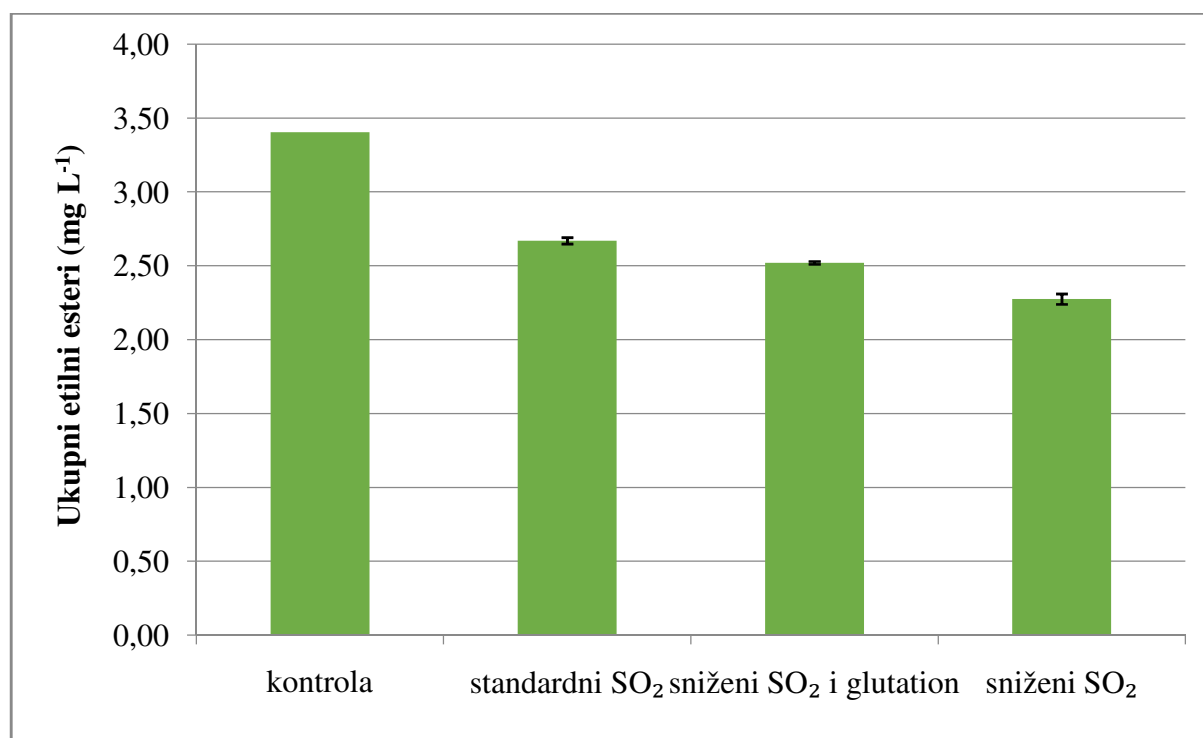
Slika 10. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih norizoprenoida u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 10. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih norizoprenoida u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih norizoprenoida 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Norizoprenoidi uglavnom nastaju djelovanjem enzima ili kiselinskom hidrolizom prekursora tijekom primarne obrade grožđa (runjenje i muljanje), međutim dio može nastati i tijekom alkoholne fermentacije (Ugliano i sur., 2006).

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih norizoprenoida, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) utječe na sporije smanjenje koncentracije ukupnih norizoprenoida. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih norizoprenoida od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Tijekom starenja vina, koncentracija norizoprenoida se smanjuje što je potvrđeno i u istraživanjima drugih autora (Silva Ferreira i sur., 2002).

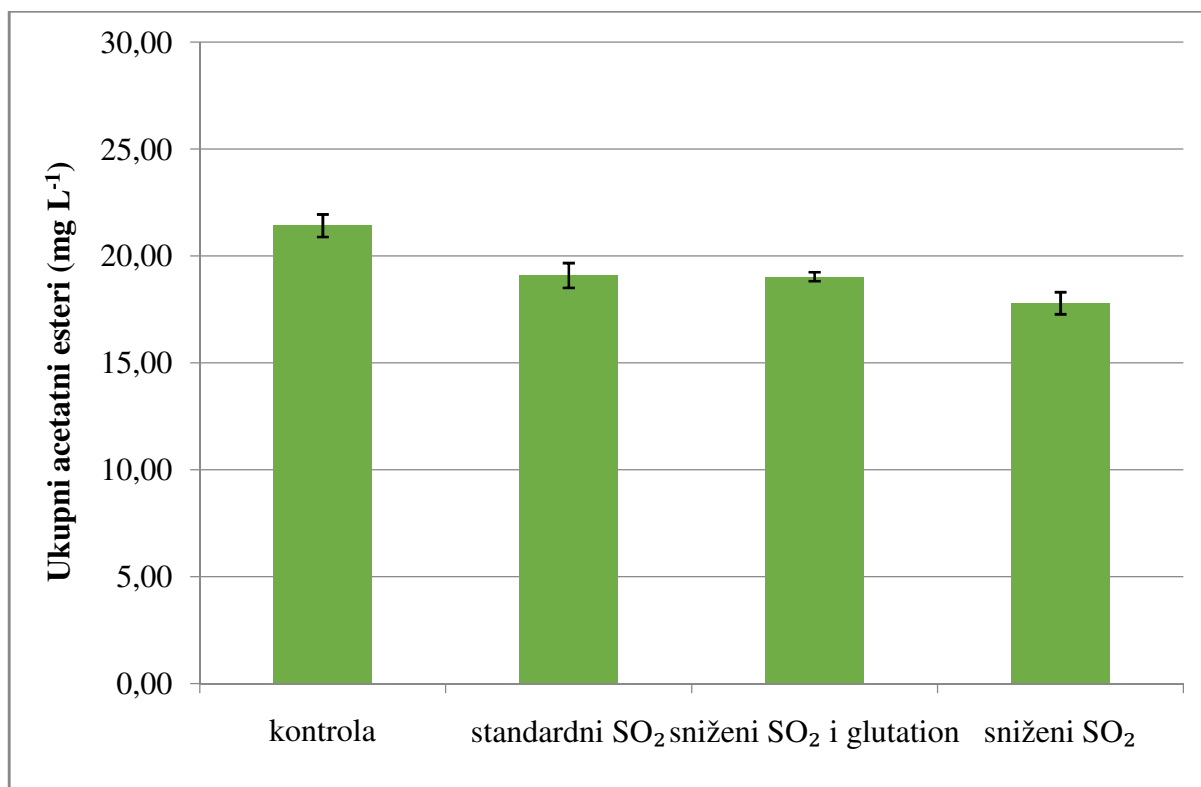


Slika 11. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih etilnih estera u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Na Slici 11. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih etilnih estera u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih etilnih estera 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija u odnosu na netretirani uzorak zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih etilnih estera, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) utječe na sporije smanjenje koncentracije ukupnih etilnih estera. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih etilnih estera od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanja drugih autora pokazala su da ultrazvuk visokih snaga ima negativan učinak na sadržaj etilnih estera, čija se koncentracija smanjuje ovisno o odabranim procesnim parametrima i sorti crnog vina (Ćurko i sur., 2017).



Slika 12. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih acetatnih estera u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Acetatni esteri su nositelji voćnih i cvjetnih aroma vina, a nastaju esterifikacijom između octene kiseline te etanola ili viših alkohola (Lambrechts i Pretorius, 2000).

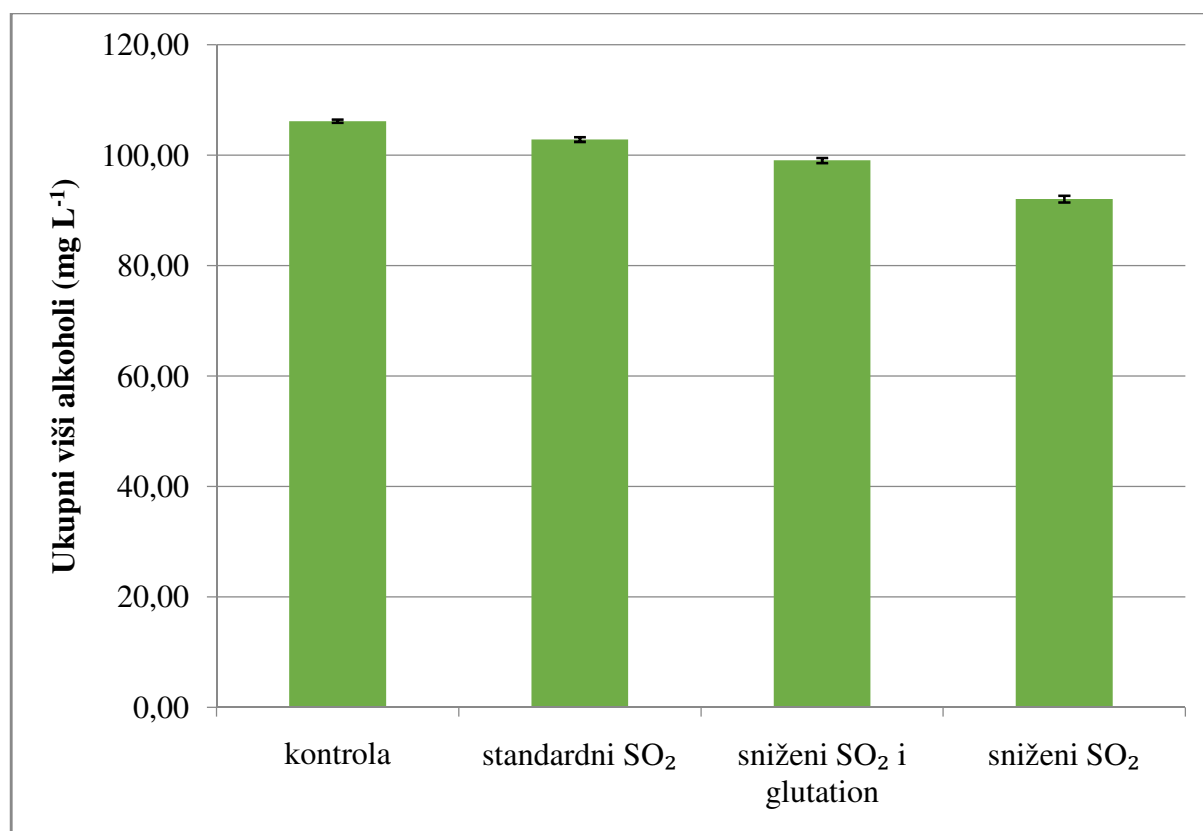
Na Slici 12. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih acetatnih estera u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih acetatnih estera 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok su nešto veće koncentracije zabilježene u uzorcima sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida i sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida uz dodatak glutatona.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih acetatnih estera, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) utječe na sporije smanjenje koncentracije ukupnih acetatnih estera. Naime,



tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih acetatnih estera od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanja drugih autora pokazala su da ultrazvuk visokih snaga ima negativan učinak na sadržaj acetatnih estera, čija se koncentracija smanjuje ovisno o odabranim procesnim parametrima i sorti crnog vina (Ćurko i sur., 2017). Negativan učinak ultrazvuka visokih snaga na hlapive komponente u vinu može se pripisati njegovom degazirajućem efektu, a to za posljedicu ima vino čiji se miris može opisati kao „kuhano“ (García Martín i sur., 2016).



Slika 13. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih viših alkohola u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

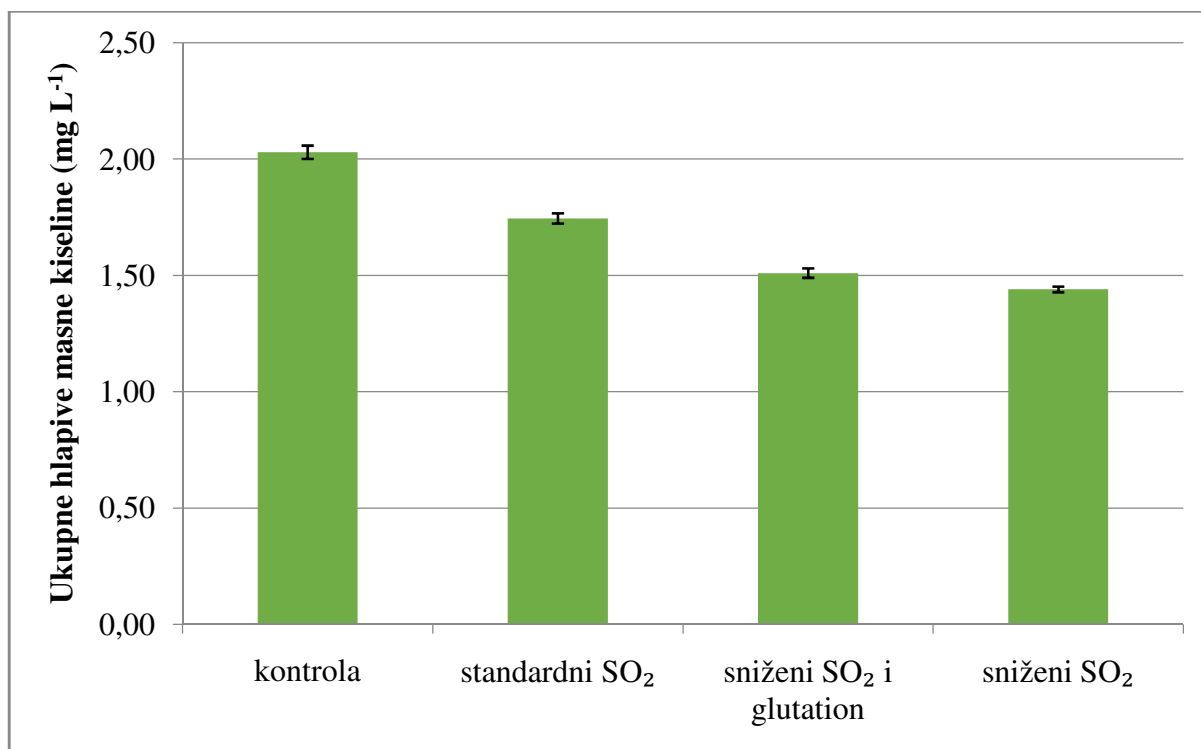
Viši alkoholi u vinu nastaju anaboličkim (metabolizmom ugljikohidrata) i kataboličkim putem (transformacijom odgovarajućih aminokiselina-Erlichova reakcija) (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a), a aroma im je uglavnom karakterizirana kao oštra, opora i kemijska. Međutim,

pri koncentracijama do  $300 \text{ mg L}^{-1}$  doprinose kompleksnosti arome, dok koncentracije veće od  $400 \text{ mg L}^{-1}$  negativno utječu na aromu vina (Jackson, 2008).

Na Slici 13. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo neznatno smanjenje koncentracije ukupnih viših alkohola u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih viših alkohola 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje neznatno smanjenje koncentracije ukupnih viših alkohola, a dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutacion) utječe na sporije smanjenje koncentracije ukupnih viših alkohola. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutacionom zadržali su veću koncentraciju ukupnih viših alkohola od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Općenito se smatra da se koncentracija viših alkohola tijekom starenja bitno ne mijenja što je potvrđeno i u ovom radu (Papadopoulou i Roussis, 2008; Roussis i sur., 2007).



Slika 14. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju ukupnih hlapivih masnih kiselina u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Općenito, hlapive masne kiseline karakterizira miris po siru i vrlo često su ove kiseline u vinu prisutne ispod senzorskog praga osjetljivosti. Međutim, unatoč niskim koncentracijama utvrđeno je kako blago niže koncentracije od vrijednosti senzorskog praga mogu pozitivno utjecati na ukupnu kompleksnost arome vina (Jackson, 2008).

Na Slici 14. grafički su prikazani rezultati analize pojedinih uzoraka 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz rezultata je vidljivo smanjenje koncentracije ukupnih hlapivih masnih kiselina u ultrazvukom tretiranim uzorcima crnog vina u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Najmanja koncentracija ukupnih hlapivih masnih kiselina 3 mjeseca nakon navedenih tretmana zabilježena je u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, dok je najveća koncentracija zabilježena u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Istraživanje u ovom radu pokazalo je da tretman ultrazvukom visokih snaga uzrokuje neznatno smanjenje koncentracije ukupnih hlapivih masnih kiselina, a dodatak antioksidansa

(sumporov dioksid i glutation) utječe na sporije smanjenje koncentracije ukupnih hlapivih masnih kiselina. Naime, tretirani uzorci vina sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida te sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida u kombinaciji s glutationom zadržali su veću koncentraciju ukupnih hlapivih masnih kiselina od onih sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Dobiveni rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima u kojima je utvrđeno da se koncentracija hlapivih masnih kiselina tijekom starenja značajno ne mijenja (Recamales i sur., 2011; Roussis i sur., 2005).

Tablica 4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na koncentraciju hlapivih spojeva u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja

Uzorci	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>Norizoprenoidi</b>				
TDN**	0,41 ± 0,05	0,31 ± 0,01	0,22 ± 0,05	0,18 ± 0,01
β-damaskenon**	0,63 ± 0,10	0,55 ± 0,05	0,52 ± 0,01	0,40 ± 0,01
<b>Etilni esteri</b>				
Etil butanoat*	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Etil heksanoat*	0,23 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Etil oktanoat*	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,08 ± 0,01
Etil dekanat*	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Dietil sukcinat*	2,85 ± 0,07	2,13 ± 0,12	2,04 ± 0,14	1,85 ± 0,01
<b>Acetatni esteri</b>				
Etil acetat*	21,18 ± 0,04	18,87 ± 0,20	18,83 ± 0,54	17,60 ± 0,52
<i>i</i> -butil acetat**	27,64 ± 0,06	25,41 ± 0,09	23,22 ± 0,55	20,70 ± 0,19
<i>i</i> -amil acetat*	0,20 ± 0,03	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,00
2-feniletal acetat*	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Viši alkoholi</b>				
<i>i</i> -amil alkohol*	83,78 ± 0,45	83,11 ± 0,75	79,77 ± 0,35	76,53 ± 0,41
1-heksanol*	1,33 ± 0,05	1,32 ± 0,12	1,25 ± 0,06	1,21 ± 0,01
<i>cis</i> -3-heksen-1-ol**	70,88 ± 0,45	68,88 ± 0,12	67,14 ± 1,08	65,41 ± 0,92
2-fenil etanol*	21,00 ± 0,60	18,35 ± 0,17	17,97 ± 0,87	14,24 ± 0,26
<b>Hlapive masne kiseline</b>				
Kaprinska kiselina*	0,77 ± 0,01	0,64 ± 0,06	0,58 ± 0,04	0,57 ± 0,06
Kaprilna kiselina*	1,15 ± 0,03	1,01 ± 0,15	0,84 ± 0,06	0,79 ± 0,05
Kaprinska kiselina*	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01

\*Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>. \*\* Koncentracija spoja izražena u µg L<sup>-1</sup>.

U Tablici 4. prikazani su rezultati analize hlapivih spojeva određenih u uzorcima vina Cabernet Sauvignon 3 mjeseca nakon primjene tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa te rezultati kontrolnog (netretiranog) uzorka.

Aroma vina značajno se mijenja tijekom starenja. Jedan od ključnih problema vezan uz proces starenja je oksidacija vina pri čemu dolazi do nekoliko važnih promjena, od kojih je jedna promjena boje, odnosno posmeđivanje. Gubitak svježih i voćnih karakteristika usko je povezan s određenim kemijskim promjenama, prvenstveno reakcijama hidrolize i oksidacije, koje uzrokuju promjene u koncentracijama određenih spojeva arome. Smanjenje koncentracija acetatnih i etilnih estera, nositelja voćnih nota vina, uglavnom je posljedica hidrolize (Roussis i sur., 2005).

Istraživanja nekih autora pokazala su da ultrazvuk visokih snaga poboljšava učinkovitost ekstrakcije većine spojeva arome za razliku od konvencionalnih metoda (García Martín i sur., 2016).

Glavni predstavnik norizoprenoida je  $\beta$ -damaskenon, a karakterizira ga cvjetna i voćna aroma te aroma po tropskom voću i kuhanoj jabuci, a ujedno ima i vrlo nizak senzorski prag osjetljivosti -  $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  (Pineau i sur., 2007). U kontrolnom (netretiranom) uzorku zabilježena je koncentracija  $\beta$ -damaskenona  $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$ . U tretiranim uzorcima zabilježeno je smanjenje koncentracije  $\beta$ -damaskenona, najznačajnije smanjenje koncentracije  $\beta$ -damaskenona od tretiranih uzoraka zabilježeno je u uzorku sa smanjenom koncentracijom sumporovog dioksida.

Sljedeći spoj TDN karakterizira aroma po kerozinu i tartufima. U uzorcima sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida i sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida uz dodatak glutaciona zabilježeno je očekivano povećanje koncentracije TDN-a, dok je smanjenje koncentracije zabilježeno u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida. Ovaj predstavnik norizoprenoida karakterističan je za aromu starenja vina, odnosno njegova koncentracija se značajno povećava starenjem vina (Simpson, 1978) što je potvrđeno u ovom radu.

Etil heksanoat predstavnik je etilnih estera, a doprinosi voćnoj aromi te aromi po jabuci, a obzirom da je određen u koncentracijama većim od senzorskog praga osjetljivosti koji iznosi

0,05 mg L<sup>-1</sup> zaključujemo da utječe na aromu tretiranih uzoraka (Tomašević, 2017). Prema nekim autorima dodatak glutaciona usporava smanjenje koncentracije ovog spoja (Roussis i sur., 2007; Roussis i Sergianitis, 2008). Iz rezultata analize koncentracije ovog spoja (Tablica 4.) vidljivo je da u odnosu na kontrolni uzorak nije došlo do značajnih promjena u uzorcima tretiranim navedenim tretmanima. Neznatno niže koncentracije zabilježene su u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

U svim analiziranim uzorcima etil oktanoat je određen u koncentracijama iznad senzorskog praga osjetljivosti (0,02 mg L<sup>-1</sup>), odnosno zaključujemo da ovaj spoj utječe na aromu tretiranih uzoraka pri čemu doprinosi aromi po kruški te slatkim notama, samim time možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga nema negativan utjecaj na ovaj spoj. Dodatak antioksidansa prema nekim autorima rezultira sporijim smanjenjem koncentracije ovog spoja (Papadopoulou i Roussis, 2008; Roussis i Sergianitis, 2008), a u ovom istraživanju se pokazalo da u odnosu na kontrolni uzorak nije došlo do značajnih promjena u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokih snaga i antioksidansima. Neznatno niže koncentracije zabilježene su u uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Aroma etil dekanoata opisuje se kao voćna, cvjetna i slatka sa senzorskim pragom osjetljivosti od 0,2 mg L<sup>-1</sup>, a obzirom na koncentracije analiziranih uzoraka (0,02-0,04 mg L<sup>-1</sup>) možemo zaključiti da ovaj spoj ne doprinosi aromi tretiranih uzoraka.

Dietil sukcinat je nositelj voćne arome te arome po dinji, sa senzorskim pragom osjetljivosti od 1,2 mg L<sup>-1</sup> (Lambrechts i Pretorius, 2000), a obzirom na koncentracije određene u analiziranim uzorcima možemo zaključiti da dietil sukcinat doprinosi aromi tretiranih uzoraka, odnosno da tretman ultrazvukom visokih snaga neznatno smanjuje koncentraciju ovog spoja. Također, iz Tablice 4. vidimo da najbolje očuvanje koncentracije ovog spoja od tretiranih uzoraka u odnosu na kontrolni (netretirani) zadržava uzorak sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida, odnosno možemo zaključiti da dodatak sumporovog dioksida utječe na očuvanje koncentracije ovog spoja. Dietil sukcinat uglavnom nastaje tijekom starenja reakcijama esterifikacije (Alves i sur., 2005). Rezultati drugih autora pokazali su kako je dodatak glutaciona u većini slučajeva rezultirao smanjenjem koncentracije ovog spoja tijekom starenja u odnosu na kontrolna vina (Papadopoulou i Roussis, 2008; Roussis i sur., 2005), što je potvrđeno i u ovom radu.

Etil acetat predstavlja koncentracijom najzastupljeniji ester u vinu, a ovisno o prisutnoj koncentraciji značajno može utjecati na senzorske karakteristike vina. Senzorski prag osjetljivosti etil acetata iznosi 160-180 mg L<sup>-1</sup> (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a), a nositelj je negativnih, oštrih nota te arome po laku za nokte i ljepilu. Na osnovu rezultata iz Tablice 4. možemo zaključiti da ovaj spoj ne utječe negativno na aromu analiziranih vina. Poznato je da pri nižim koncentracijama (60-90 mg L<sup>-1</sup>) doprinosi kompleksnosti arome (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a).

Koncentracije *i*-butil acetata prikazane su u Tablici 4., *i*-butil acetat je nositelj voćne arome, arome po jabuci i banani sa senzorskim pragom osjetljivosti od 1,6 mg L<sup>-1</sup> (Escudero i sur., 2007). Obzirom da su koncentracije u analiziranim vinima određene u rasponu od 20,70 do 27,64 µg L<sup>-1</sup>, možemo zaključiti da ovaj spoj ne utječe na aromu analiziranih vina.

U Tablici 4. prikazane su koncentracije *i*-amil acetata u tretiranim vinima, senzorski prag osjetljivosti *i*-amil acetata je 0,26 mg L<sup>-1</sup>, a nositelj je poželjnih nota po banani i kruški (Lambrechts i Pretorius, 2000). Obzirom na navedeno i obzirom da su koncentracije u analiziranim vinima određene u rasponu od 0,17 do 0,20 mg L<sup>-1</sup>, možemo zaključiti da ovaj spoj bitno ne utječe na aromu analiziranih vina.

Općenito, 2-feniletal acetat je nositelj voćne arome te mirisa po ruži sa senzorskim pragom osjetljivosti od 0,25 mg L<sup>-1</sup> (Swiegers i sur., 2005). Obzirom na navedeno i obzirom da su koncentracije u analiziranim vinima određene u rasponu od 0,01 do 0,02 mg L<sup>-1</sup> jasno je da ovaj spoj ne doprinosi aromi analiziranih vina.

Viši alkoholi su nepoželjni u visokim koncentracijama jer uklanjaju svježinu i voćnost, ali pri nižim koncentracijama pozitivno utječu na ukupnu kvalitetu vina. Općenito se smatra da se koncentracija viših alkohola tijekom starenja bitno ne mijenja (Papadopoulou i Roussis, 2008; Roussis i sur., 2005; Roussis i sur., 2007).

Pretpostavka je da dodatak antioksidansa značajno ne utječe na koncentraciju *i*-amil alkohola, a to je potvrđeno i u prethodnim istraživanjima (Roussis i sur., 2007). Možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga uz dodatak antioksidansa značajno ne utječe na koncentracije ovog spoja. U uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida koncentracija *i*-amil alkohola je neznatno promijenjena u odnosu na kontrolni (netretirani)

uzorak, dok su nešto manje koncentracije zabilježene u druga dva uzorka. Senzorski prag osjetljivosti *i*-amil alkohola je  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , a pri nižim koncentracijama karakterizira ga slatkasta aroma (Ferreira, 2010). Dobiveni rezultati su u skladu s prethodnim istraživanjima (Lambrechts i Pretorius, 2000; Selli i sur., 2006). Možemo zaključiti da se navedeni spoj u analiziranim vinima nalazi znatno iznad senzorskog praga osjetljivosti te da pridonosi aromi analiziranog vina.

U Tablici 4. prikazane su koncentracije 1-heksanola u analiziranim vinima, senzorski prag osjetljivosti 1-heksanola je  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$ , a nositelj je vegetativnih nota, po zelenom i svježem pokošenoj travi (Peinado i sur., 2004). Obzirom na navedeno i obzirom da su koncentracije u analiziranim vinima određene u rasponu od  $1,21$  do  $1,33 \text{ mg L}^{-1}$ , možemo zaključiti da ovaj spoj doprinosi aromi analiziranih vina. Možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga utječe na neznatno smanjenje koncentracije ovog spoja, a najbolje očuvanje koncentracije u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak zabilježeno je u uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida.

Obzirom da je senzorski prag osjetljivosti *cis*-3-heksenola  $0,4 \text{ mg L}^{-1}$  (Escudero i sur., 2007) i obzirom da su koncentracije u analiziranim vinima određene u rasponu od  $67,14$  do  $70,88 \mu\text{g L}^{-1}$ , možemo zaključiti da ovaj spoj ne utječe na aromu analiziranih vina.

Feniletil alkohol ili 2-fenil etanol je nositelj arome po medu i ruži te se smatra jedinim predstavnikom viših alkohola čija je prisutnost u vinu uvijek poželjna (Ribéreau-Gayon i sur., 2006a). U analiziranim vinima određen je u rasponu koncentracija od  $14,24$  do  $21,00 \text{ mg L}^{-1}$ . Senzorski prag osjetljivosti feniletil alkohola je  $14 \text{ mg L}^{-1}$  (Peinado i sur., 2004) pa možemo zaključiti da ovaj spoj potencijalno utječe na aromu analiziranih vina. Na osnovu rezultata iz Tablice 4. možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga utječe na neznatno smanjenje koncentracije ovog spoja. U uzorku sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida zabilježeno je najbolje očuvanje koncentracije ovog spoja 3 mjeseca nakon tretmana, dok je u tretiranom uzorku sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida zabilježena najmanja koncentracija ovog spoja. S obzirom na to, možemo zaključiti da dodatak antioksidansa utječe na očuvanje koncentracije ovog spoja.

Budući da su rezultati različitih autora neujednačeni vezano za utjecaj ultrazvuka na acetaldehide, više alkohole i terpene, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se ustanovili



uvjeti i postupci u kojima ultrazvučna polja mogu poboljšati sadržaj hlapivih spojeva u vinu (García Martín i Sun, 2013).

Koncentracije kapronske kiseline u tretiranim uzorcima vina Cabernet Sauvignon prikazane su u Tablici 4. i vidimo da su one očekivano ispod senzorskog praga osjetljivosti kapronske kiseline koji iznosi  $3 \text{ mg L}^{-1}$  (Ferreira, 2010). Možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga i dodatak antioksidansa nema značajan utjecaj na koncentracije kapronske kiseline te da pri tako niskim koncentracijama ne utječe na aromu tretiranih vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja.

Koncentracije kaprilne kiseline u tretiranim uzorcima vina Cabernet Sauvignon prikazane su u Tablici 4. i vidimo da su one očekivano daleko ispod senzorskog praga osjetljivosti kaprilne kiseline koji iznosi  $7 \text{ mg L}^{-1}$  (Ferreira, 2010). Možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga i dodatak antioksidansa nema značajan utjecaj na koncentracije kaprilne kiseline te da pri tako niskim koncentracijama ne utječe na aromu tretiranih vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja.

Koncentracije kaprinske kiseline u tretiranim uzorcima vina Cabernet Sauvignon prikazane su u Tablici 4. i vidimo da su one očekivano daleko ispod senzorskog praga osjetljivosti kaprinske kiseline koji iznosi  $15 \text{ mg L}^{-1}$  (Ferreira, 2010). Možemo zaključiti da tretman ultrazvukom visokih snaga i dodatak antioksidansa nema značajan utjecaj na koncentracije kaprinske kiseline te da pri tako niskim koncentracijama ne utječe na aromu tretiranih vina Cabernet Sauvignon nakon 3 mjeseca starenja.

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata analize uzoraka crnog vina sorte Cabernet Sauvignon, tretiranih ultrazvukom visokih snaga uz dodatak antioksidansa u odnosu na kontrolno (netretirano) vino, nakon 3 mjeseca starenja, može se zaključiti:

1. Tretman ultrazvukom visokih snaga utjecao je na blago smanjenje koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu, pri čemu je viša koncentracija antioksidansa (sumporov dioksid i glutacion) rezultirala boljim očuvanjem koncentracije analiziranih spojeva.
2. Tretman ultrazvukom visokih snaga nije značajno utjecao na koncentraciju ukupnih tanina u vinu, ali je utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana, posebice u vinima sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida te bez dodatka glutaciona.
3. Primjena ultrazvuka visokih snaga rezultirala je blagim smanjenjem koncentracije spojeva arome u prvom redu estera, hlapivih masnih kiselina i norizoprenoida, posebice u vinima sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida te bez dodatka glutaciona.
4. Primjenom ultrazvuka visokih snaga nije narušena kvaliteta crnog vina, a kemijske promjene u polifenolnom i aromatskom sastavu vina uočene djelovanjem primijenjene tehnike identične su onima koje se u vinu odvijaju tijekom prirodnog procesa starenja te ukazuju na mogućnost primjene ove tehnike kao efikasne metode za ubrzavanje starenja vina.

## 6. LITERATURA

- Allen, M.S., Lacey, M.J., Brown, W.V., Harris, R.L.N. (1990) Occurrence of methoxypyrazines in grapes of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon and Sauvignon blanc. *Actualités Oenologiques* **89**, 25-30.
- Allen, M.S., Lacey, M.J., Harris, R.L., Brown, W.V. (1991) Contribution of methoxypyrazines to Sauvignon blanc wine aroma. *Am. J. Enol. Viticult.* **42**, 109-112.
- Alpeza, I. (2008) Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik Zaštite Bilja* [online] **31**, 143-150, <<https://hrcak.srce.hr/>> . Pristupljeno 03. lipnja 2019
- Alves, R., Nascimento, A., Nogueira, J. (2005) Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **546**, 11-21.
- Bachmann, J.A., Wilkins R. (1937) Method of treatment for fermented and distilled beverages and the like. US Patent 2086891.
- Bakker, J., Timberlake, C.F. (1997) Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agr. Food Chem.* **45** (1), 35-43.
- Batur, V., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z., Badanjak, M. (2010) Utjecaj ultrazvuka visoke snage na reološka svojstva i svojstva pjenjenja modelnih sladolednih smjesa. *Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka* [online] **60**, 10-18, <<https://hrcak.srce.hr/>> . Pristupljeno 03. lipnja 2019
- Black, C.A., Parker, M., Siebert, T.E., Capone, D.L., Francis, I.L. (2015) Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Aust. J. Grape Wine R.* **21**, 582-600.
- Blanchard, L., Darriet, P., Dubourdieu, D. (2004) Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: Impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 115-120.
- Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Viticult.* **52**, 67-87.
- Brajkovich, M., Tibbits, N., Peron, G., Lund, C.M., Dykes, S.I., Kilmartin, P.A., Nicolau, L. (2005) Effect of Screwcap and Cork Closures on SO<sub>2</sub> Levels and Aromas in a Sauvignon Blanc Wine. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 10006 – 10011.

Bratowsky, E.J., Henschke, P.A. (2004) The "buttery" attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 23-252.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Topić Vikić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvat. Cas. Prehrambenu Tehnol. Biotehnol. Nutr.* [online] **4**, 32-37, <<https://hrcak.srce.hr/>> .  
Pristupljeno 03. lipnja 2019

Brouillard, R. (1982) Chemical structure of anthocyanins. U: Anthocyanins as Food Colors, (Markakis, P., ured.), Academic Press Inc., New York, str. 1-38.

Cacciola, V., Ferran Batlló, I., Ferraretto, P., Vincenzi, S., Celotti, E. (2013) Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 311–317.

Chang, A.C. (2005) Study of ultrasonic wave treatments for accelerating the aging process in a rice alcoholic beverage. *Food Chem.* **92**, 337–342.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D. (1998) Comparative study of the characteristic of American white oak and European oak for production of barrels used in barrel aging of wines. *Am. J. Enol. Viticult.* **49**, 79-85.

Cheyrier, V., Souquet, J., Moutounet, M. (1989) Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* **40**, 320-324.

Clarke, R.J., Bakker, J. (2004) Volatile components. U: Wine flavour chemistry, (Clarke, R. J., Bakker, J., ured.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, str. 133-201.

Coetzee, C., Du Toit, W.J. (2012) A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Res. Int.* **45**, 287-298.

Comuzzo, P., Zironi, R. (2013) Biotechnological strategies for controlling wine oxidation. *Food Eng. Rev.* **5**, 217-229.

Ćurko, N., Kelšin, K., Režek Jambrak, A., Tomašević, M., Gracin, L., Poturica, V., Ružman, E., Kovačević Ganić, K. (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **9**, 136-144.

- Delfini, C., Costa, A. (1993) Effects of the Grape Must Lees and Insoluble Materials on the Alcoholic Fermentation Rate and Production of Acetic Acid, Pyruvic Acid, and Acetaldehyde. *Am. J. Enol. Vitic.* **44**, 102-107.
- Demmig-Adams, B., Adams, W.W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **1**, 21-26.
- Dubourdieu, D., Lavigne-Cruege, V. (2004) The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. *Vinidea* **2**, 1-9.
- Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2007) Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4501-4510.
- Esti, M., Tamborra, P. (2006) Influence of winemaking techniques on aroma precursors. *Anal. Chim. Acta* **563**, 173-179.
- Ferraretto, P., Cacciola, V., Ferran Batllò, I., Celotti, E. (2013) Ultrasound application in winemaking: Grape maceration and yeast lysis. *Ital. J. Food Sci.* **25**, 160–168.
- Ferraretto, P., Celotti, E. (2016) Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CyTA–J. Food* **14**, 1-7.
- Ferreira, V.(2010) Volatile aroma compounds and wine sensory attributes. U: Managing wine quality, (Reynolds, A.G., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 5-28.
- Fleet, G.H. (1993) Malolactic fermentation. U: Wine microbiology and biotechnology, (Fleet, G.H., ured.), Harwood Academic Publishers, Sidney, str. 314-317.
- Francis, I.L., Newton, J.L. (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Aust. J. Grape Wine R.* **11**, 114-126.
- García Martín, J.F., Zhang, Q.A., Feng, C.H. (2016) Ultrasound for accelerating the wine aging process from physicochemical point of view. U: Applications of Ultrasound in the Beverage Industry, (García Martín, J. F., ured.), Nova Science Publishers, New York, str. 89-110.
- García Martín, J.F., Guillemet, L., Feng, C., Sun, D-W. (2013) Cell viability and proteins release during ultrasound-assisted yeast lysis of light lees in model wine. *Food Chem.* **141**, 934–939.

García Martín, J.F., Sun, D-W. (2013) Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends Food Sci. Tech.* **33**, 40–53.

Gawel, R., Iland, P.G., Francis, I.L. (2001) Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Qual. Prefer.* **12**, 83-94.

Gunata, Z., Dugellay, L., Sapis, J.C., Baumes, R., Bayonove, C. (1993) Role of enzymes in the use of the flavor from grape glycosides in winemaking. U: Progress in Flavour precursors studies, (Schreier, P., Winterhalter. P., ured.), Allured Publishing Corporation, Chicago, str. 219-234.

Guth, H., Sies, A. (2002) Flavour of wines: Towards an understanding by reconstitution experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds. Proceedings of the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, Australia, str. 128-139.

Jackson, R.S. (1994) Wine Science, Academic Press, Cambridge.

Jackson, R.S. (2008) Wine science – principles, practice, perception, 2. izd., Academic Press, San Diego.

Jagatić Korenika, A., Naletilić, I., Mihaljević Žulj, M., Puhelek, I., Jeromel, A. (2015) Utjecaj roka berbe i temperature maceracije na polifenolni sastav grožđa i vina sorte Frankovka (*Vitis vinifera* L.). *Glasnik Zaštite Bilja* [online] **38**, 92-100, <<https://hrcak.srce.hr/>> . Pristupljeno 03. lipnja 2019

Kalkan Yıldırım, H., Dündar, E. (2017) New techniques for wine aging. *BIO Web of Conf.* **9**, 2-12.

Kritzinger, E.C., Bauer, F.F., Du Toit, W.J. (2013) Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 269-277.

Kuijpers, W.A., van Eck, D., Kemmere, M.F., Keurentjes, J.T.F. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide. *Science* **298**, 1969-1971.

Lambrechts, M., Pretorius, I. (2000) Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97–129.

- Leighton, T.G. (1998) The principles of cavitation. U: *Ultrasound in Food Processing*, (Povey, M. J. W., Mason, T.J., ured.), Blackie Academic & Professional, London, str. 151-182.
- Lelas, V. (2006) Nove tehnike procesiranja hrane. *Mljekarstvo* [online], **56**, 311-330, <<https://hrcak.srce.hr/>>. Pristupljeno 03. lipnja 2019
- Li, B., Sun, D-W. (2002) Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing. *J. Food Eng.* **55** (3), 277-282.
- Li, H., Guo, A., Wang, H. (2008) Mechanism of oxidative browning of wine. *Food Chem.* **108**, 1–13.
- Lillard, H. S. (1994) Decontamination of poultry skin by sonication. *Food Technol. (Chicago)* **48**, 72-73.
- Lima, M., Sastry, S. K. (1990) Influence of fluid rheological properties and particle location on ultrasound-assisted heat transfer between liquids and particles. *J Food Sci.* **55**, 1112-1115.
- Liu, S.Q., Pilone, G.J. (2000) An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implication. *Int. J. Food Sci. Tech.* **35**, 49-61.
- Lopes, P., Silva, M.A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P., Teissedre, P.L., Dubourdieu, D. (2009) Impact of Oxygen Dissolved at Bottling and Transmitted through Closures on the Composition and Sensory Properties of a Sauvignon Blanc Wine during Bottle Storage. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 10261 –10270.
- López M., Martínez F., Del Valle C., Orte C., Miró M. (2001) Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **922**, 359-363.
- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P.-L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet-Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009-vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* **126**, 1991-1999.
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R. (1995) The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 195-200.
- Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996) The uses of ultrasound in food technology. *Ultrason. Sonochem.* **3**, 253–260. doi:10.1016/S1350-4177(96)00034-X

McClements, D.J., (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 293–299.

Moreno Arribas, M.V., Polo, C. (2008) Wine Chemistry and Biochemistry, Springer Science and Business Media, New York.

OIV (2017) *Code International des Pratiques Œnologiques*, Organisation Internationale de la vigne et du vin, Organisation Internationale de la vigne et du vin, Paris.

Papadopoulou, D., Roussis, I.G. (2001) Inhibition of the decline of linalool and  $\alpha$ -terpineol in muscat wines by glutathione and N-acetyl-cysteine. *Ital. J. Food Sci.* **13**, 413-419.

Papadopoulou, D., Roussis, I.G. (2008) Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. *Int. J. Food Sci. Tech.* **43**, 1053-1057.

Patist, A., Bates, D. (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9**, 147–154.

Peinado, R.A., Moreno, J., Bueno, J.E., Moreno, J.A., Mauricio, J.C. (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.* **84**, 585-590.

Pérez Coello, M.S., González Viñas, M.A., García Romero, E., Díaz Maroto, M.C., Cabezudo, M.D. (2003) Influence of storage temperature on the volatile compounds of young white wines. *Food Control* **14**, 301-306.

Peynaud, E. (1996) The Taste of Wine: The Art and Science of Wine Appreciation, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.

Pichler, A., Pozderović, A., Prskalo, A., Andrašek, I., Kopjar M. (2015) Utjecaj geografskih i klimatskih uvjeta na sadržaj tvari arome, polifenola i antocijana u crnim vinima erdutskog vinogorja istočne Slavonije. *Glasnik Zaštite Bilja* [online] **38**, 34-43, <<https://hrcak.srce.hr/>> .  
Pristupljeno 03. lipnja 2019

Pine, S.H. (1994) Organska kemija, 3. izd. (preveli Bregovec, I., Rapić V.) Školska knjiga, Zagreb.

Pineau, B., Barbe, J-C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2007) Which impact for  $\beta$ -damascenone on red wines aroma? *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4103-4108.



Povey, M.J.W., Mason, T.J. (1998) Ultrasound in food processing, Blackie Academic & Professional, London.

Pravilnik o proizvodnji vina (2005) *Narodne Novine* **02**, Zagreb.

Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.

Rastija, V., Medić-Šarić, M. (2009) Kromatografske metode analize polifenola u vinima. *Kem. Ind.* [online] **58**, 121-128, <<https://hrcak.srce.hr/>> . Pristupljeno 03. lipnja 2019

Rastija, V., Mihaljević K., Drenjančević, M., Jukić, V. (2016) Korištenje saznanja o polifenolnom profilu hrvatskih vina u marketinške svrhe. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi* **5**, 39-56. doi: <https://doi.org/10.21857/yrvgqtpxw9>

Recamales, A.F., Gallo, V., Hernanz, D., González-Miret, M.L., Heredia, F.J. (2011) Effect of time and storage conditions on major volatile compounds of Zalema white wine. *J. Food Qual.* **34**, 100-110.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006a) Handbook of enology Vol. 1, The Microbiology of Wine and Vinifications, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, J., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006b) Handbook of enology Vol. 2, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of anthocyanins in red wine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2642–2659.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **48**, 188–192.

Robinson, A.L., Boss, P.K., Solomon, P.S., Trengove, R.D., Heymann, H., Ebeler, S.E. (2014) Origins of grape and wine aroma. Part 1. Chemical components and viticultural impacts. *Am. J. Enol. Viticult.* **65**, 1-24.

Roujou de Boubée, D., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. (2000) Organoleptic impact of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine on red Bordeaux and Loire wines. Effect of environmental conditions on concentrations in grapes during ripening. *J. Agr. Food Chem.* **48**, 4830-4834.

- Roussis, I.G., Lambropoulos, I., Papadopoulou, D. (2005) Inhibition of the decline of volatile esters and terpenols during oxidative storage of Muscat-white and Xinomavro-red wine by caffeic acid and N-acetyl-cysteine. *Food Chem.* **93**, 485-492.
- Roussis, I.G., Lambropoulos, I., Tzimas, P. (2007) Protection of Volatiles in a Wine with Low Sulfur Dioxide by Caffeic Acid or Glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.* **58**, 274-278.
- Roussis, I.G., Sergianitis, S. (2008) Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour Frag. J.* **23**, 35-39.
- Sala, C., Mestres, M., Martí, M.P., Busto, O., Guasch, J. (2000) Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A.* **880**, 93-99.
- Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New Methods of Food Preservation*, (Could, G.W. ured.), Blackie Academic & Professional, London.
- Selli, S., Canbas, A., Cabaroglu, T., Erten, H., Günata, Z. (2006) Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment. *Food Chem.* **94**, 319- 326.
- Silva Ferreira, A.C., Guedes De Pinho, P., Rodrigues, P., Hogg, T. (2002) Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5919-5924.
- Simpson, R. (1978) Aroma and compositional changes in wine with oxidation, storage and ageing. *VITIS-J. Grapevine Res.* **17**, 274.
- Singleton, V.L., Rossi, J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-147.
- Somers, T.C. (1982) Pigment phenomena - From grapes to wine. U: *Grape Wine Centennial Symposium Proceedings*, (Webb, A.D., ured.), University of California, Davis, str. 254-257.
- Somers, T.C., Vérette, E. (1988) Phenolic composition of natural wine types. U: *Wine Analysis*, (Linskens, H.F., Jackson, J.F., ured.), Springer-Verlag, Berlin, str. 219-257.

- Sonni, F., Clark, A.C., Prenzier, P.D., Riponi, C., Scollary, G.R. (2011) Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair In a model white wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 3940–3949.
- Sun, D-W., Li, B. (2003) Microstructural change of potato tissues frozen by ultrasound-assisted immersion freezing. *J. Food Eng.* **57**, 337–345. doi:10.1016/S0260 8774(02) 00354-0
- Suslick, K.S. (1988) *Ultrasounds: its Chemical, Physical and Biological Effects*, VCH Publishers, New York.
- Suslick, K.S. (1989) The Chemical Effects of Ultrasound. *Sci. Am.* **260**, 80-86.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., Pretorius, I. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 139-173.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S. (2005) Yeast Modulation of Wine Flavour. *Adv. Appl. Microbiol.* **57**, 131-175.
- Thakur, B.R., Nelson, P.E. (1997) Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. *Die Nahrung* **41**, 299.
- Timbo, B., Koehler, K.M., Wolyniak, C., Klontz, K.C. (2004) Sulfites - a food and drug administration review of recalls and reported adverse events. *J. Food Prot.* **67**, 1806-1811.
- Tirelli, A., Fracassetti, D., De Noni, I. (2010) Determination of reduced cysteine in oenological cell wall fractions of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 4565-4570.
- Tomašević, M. (2017) Utjecaj enoloških postupaka na sastav arome vina Pošip. Disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.
- Tominaga, T., Murat, M.L., Dubourdieu, D. (1998) Development of a method for analyzing the volatile thiols involved in the characteristic aroma of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *J. Agr. Food Chem.* **46**, 1044-1048.
- Ugliano, M., Bartowsky, E.J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P. A. (2006) Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6322-6331.

- Vally, H., Misso, N.L., Madan, V. (2009) Clinical effects of sulphite additives. *Clin. Exp. Allergy* **39**, 1643-1651.
- Vercet, A., Lopez, P., Burgos, J. (1997) Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. *J. Dairy Sci.* **80**, 29.
- Webber, V., Dutra, S.V., Spinelli, F.R., Carnieli, G.J., Cardozo, A., Vanderlinde, R. (2017) Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chem.* **216**, 254-259.
- Webber, V., Dutra, S.V., Spinelli, F.R., Marcon, Â.R., Carnieli, G.J., Vanderlinde, R. (2014) Effect of glutathione addition in sparkling wine. *Food Chem.* **159**, 391-398.
- Zhang, Q-A., Shen, Y., Fan, X-H., García Martín, J.F. (2016) Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA–J. Food* **14**, 55-64.
- Zheng, L.Y., Sun, D-W. (2006) Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes - A review. *Trends Food Sci. Technol.* **17**, 16–23.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

---